

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo dos determinantes ambientais e genéticos que promovem o crescimento de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em biofilme: o papel dos genes *pks1* e *pks15***

**Ana Sofia Lopes Prata**

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientada por:

Doutora Mónica Vieira Cunha

2016



**Estudo dos determinantes ambientais e genéticos que promovem o crescimento de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em biofilme: o papel dos genes *pks1* e *pks15***

**2016**

**Ana Sofia Lopes Prata**

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P. sob a orientação científica da Doutora Mónica Vieira Cunha, no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## Agradecimentos

O meu obrigado às mudanças, às pessoas que me transformam para mais e melhor do que alguma vez seria sem elas na minha vida.

Agradeço ao INIAV IP e ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia da UEISPSA o acolhimento do trabalho experimental que estive na base desta dissertação. Agradeço ainda a disponibilização de parte dos isolados de *M. bovis* incluídos no presente estudo. À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, IP), agradeço o financiamento no âmbito do projeto com a referência PTDC/CVT/117794/2010 e com enquadramento no Projecto 3599 – *Promover a Produção Científica e Desenvolvimento Tecnológico e a Constituição de Redes Temáticas*.

À minha orientadora de tese, por me fazer ver que há sempre um pedaço de mim que pode dar mais. Por me mostrar um caminho, obrigado Doutora Mónica Vieira Cunha.

Aos colegas de laboratório que se tornam autênticos cadernos de memória e estão lá para apoiar qualquer momento. Por ajudarem esta mente dispersa, obrigado Ana Reis, Catarina Brás, Marta Vaz, e Tiago Baeta.

Aos colegas de escola que se tornaram amigos e hoje, apesar da distância, pouco nos separa. Por me mostrarem que a amizade é mais do que boa companhia, é para os bons e maus momentos, obrigado Alexandra Castelo, Ana Russo, Fábio Luz, Mickael Bartikian, Bárbara Santos, Ana Drumond, Natielle Gonçalves e Carolina Feliciano.

Aos professores que se tornaram apoiantes incansáveis e com alertas constantes. Por fazerem de mim muito do que hoje sou, obrigado Magda Cardoso, Maria Fernanda Santiago, Joana Barradas, Marília Peres, Fernanda Oliveira, Margarida Carrolo, Maria de Fátima Reis, Lélia Chambel e Helena Vieira.

À família que se tornou um muro de lamentações interativo, sempre pronta a ouvir os problemas, mas igualmente disponível a pensar em soluções. Porque sem vós nada seria possível, obrigado Ana Cristina Prata, Fernando Prata, José Prata, Noémia Prata e Pedro Prata.

Ao Pedro Simões, por me mostrar que há mais nesta vida que trabalho árduo e objetivos profissionais, e à sua família, por me apoiar.

Por último, o meu obrigado a todos que tocaram a minha vida: cada um de vós mudou um pouco de mim, e estejam onde estiverem, guardo-vos com muito carinho, para sempre

# Índice

Agradecimentos.....	III
Índice de Figuras .....	VI
Índice de Tabelas .....	VIII
Resumo .....	IX
Abstract.....	XIII
Abreviaturas e acrónimos .....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1.Tuberculose humana (TB).....	1
1.2.Tuberculose animal .....	1
1.3. <i>Mycobacterium</i> spp.....	2
1.4. Relevância biológica da parede celular das micobactérias.....	6
1.5. Relevância da associação das micobactérias em biofilmes no contexto da infecção: hipóteses e evidências .....	9
2. Introdução ao tema da tese e objetivos .....	10
3. Materiais e Métodos .....	11
3.1 Análise <i>in silico</i> dos polimorfismos nucleotídicos e aminoacídicos de <i>pks15</i> e <i>pks1</i> em isolados de <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> e modelação da estrutura tridimensional das respetivas proteínas .....	11
3.2 Caracterização e manutenção de culturas e condições de crescimento de pré-inóculos e inóculos em meio sólido e líquido.....	12
3.3 Análise de polimorfismos da região intergénica <i>pks15/pks1</i> em isolados de campo de <i>M.</i> <i>bovis</i> por PCR e sequenciação .....	13
3.4 Efeito de stresses ambientais na formação de biofilmes e sobrevivência celular .....	13
3.5 Análise do crescimento celular perante diferentes condições ambientais .....	14
3.6 Análise estatística dos resultados.....	14
3.7 Perfil lípidico de <i>M. bovis</i> II em diferentes condições ambientais .....	14
3.8 Análise transcricional dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> para a estirpe <i>M. bovis</i> II .....	15
3.9 Construção de um mutante de eliminação de gene <i>pks1</i> por transdução especializada..	16
4. Resultados e discussão .....	18
4.1 Análise <i>in silico</i> de sequências nucleotídicas e aminoacídicas dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> ..	18

4.2. Análise de polimorfismos da região intergénica dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> em isolados de campo de <i>M. bovis</i> .....	25
4.3. Avaliação da resposta fisiológica de micobactérias selecionadas a condições de stresse ambiental que mimetizam o ambiente do hospedeiro: efeito no crescimento em descontínuo e na formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	25
4.4. Características dos perfis lipídicos da estirpe de campo <i>M. bovis</i> II quando exposta a diferentes condições ambientais .....	36
4.5. Análise do perfil de expressão genética dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> durante o crescimento em descontínuo de <i>M. bovis</i> em condições de crescimento selecionadas.....	39
4.6. Construção de um mutante de eliminação de <i>pks1</i> por transdução especializada .....	41
5. Discussão final e perspetivas futuras.....	42
6. Referências bibliográficas .....	44
6. Anexos.....	47

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Distribuição geográfica dos casos de tuberculose bovina declarados por país à OIE, entre Julho e Dezembro de 2015.....	1
Figura 1.2: Morfologia de colónias de <i>Mycobacterium</i> spp. ....	2
Figura 1.3: Esquema proposto para a filogenia e evolução do MTC.....	4
Figura 1.4.: Representação esquemática da parede celular de micobactérias, com destaque para os lípidos de superfície.....	6
Figura 1.5: Organização genética do <i>locus</i> DIM + PGL em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	7
Figura 1.6: Representação esquemática e simplificada da biossíntese de DIM, PGL e ácidos micocerósicos.....	8
Fig. 3.7: Esquema ilustrativo do protocolo de transdução especializada para construção do mutante de eliminação de <i>pks1</i> .....	16
Figura 4.8: Representação esquemática da localização dos genes <i>pks1</i> e <i>pks15</i> na cadeia complementar do genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e tamanho relativo dos domínios funcionais, de acordo com resultados de pesquisa de homologia.....	18
Figura 4.9: Frequência relativa (em percentagem) de estirpes com alterações nucleotídicas nos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> , e respetivos domínios, usando como referência o genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. ....	19
Figura 4.10: Frequência relativa (em percentagem) de estirpes com polimorfismos aminoacídicos em Pks15 e Pks1 calculada e representada pelos respetivos domínios.....	20
Figura 4.11: Representação das sequências nucleotídicas e aminoácidas deduzidas das regiões correspondentes à extremidade 3' do gene <i>pks15</i> e 5' do gene <i>pks1</i> em várias estirpes selecionadas de entre os perfis analisados para polimorfismos.....	22
Figura 4.12: Cladograma representativo da distribuição de acontecimentos genómicos nos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> . ....	24
Figura 4.13: Principais resultados da análise de polimorfismos da região intergénica dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> em isolados de campo <i>M. bovis</i> . ....	25
Figura 4.14: Efeito exercido pelo colesterol na formação de biofilmes e sobrevivência em <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo .....	27

Figura 4.15. Efeito exercido pelo peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), ácido ascórbico, e metil de viologénio (MV) na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo.....	28
Figura 4.16: Efeito exercido pelo nitrato de sódio na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo .....	29
Figura 4.17: Efeito exercido pelo nitrato de sódio, peróxido de hidrogénio e colesterol na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em <i>M. bovis</i> .....	30
Figura 4.18: Efeito exercido pelo ácido ascórbico, nitrato de sódio, ácido ascórbico e nitrato de sódio, metil de viologénio, ácido ascórbico e metil de viologénio na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em <i>M. bovis</i> . ....	32
Fig. 4.19. Efeito no crescimento celular em descontínuo de <i>M. bovis</i> II na presença de diferentes condições ambientais. ....	35
Figura 4.20: Análise por TLC de lípidos celulares de <i>M. bovis</i> II extraídos de meios quimicamente distintos .....	37
Figura 4.21: Análise por TLC de lípidos celulares de <i>M. bovis</i> II.....	38
Figura 4.22: Quantificação relativa de transcritos de <i>pks15</i> e <i>pks1</i> por RT-qPCR.....	40
Figura 4.23: Expressão relativa dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> , determinada por RT-qPCR em <i>M. bovis</i> II, quando crescida na presença de diferentes compostos.....	40
Figura 4.24: Géis representativos de diferentes etapas do processo de construção de um mutante de eliminação do gene <i>pks1</i> por transdução especializada. ....	41
Figura 5.25: Interações previstas <i>in silico</i> : A: entre a proteína Pks15 de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e outras proteínas presentes no seu genoma (com elevada confiança: $\geq 0,7$ ); B: entre a proteína Pks15-1 de <i>M. bovis</i> AF2122/97 e outras proteínas presentes no seu genoma (com confiança média: $\geq 0,4$ ).....	44

## Índice de tabelas

Tabela 3.1: Pré-inóculos usados, respectivos meios de crescimento e períodos de incubação.....	12
Tabela 3.2. – Condições e características dos crescimentos em descontínuo para <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo.....	14
Tabela 3.3.– Características e informações disponíveis sobre os plasmídeos utilizados na presente dissertação. ....	17
Tabela 4.4: Total e tipo de alterações registradas nas sequências nucleotídicas dos genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> , por domínio, para as estirpes <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> que apresentavam pelo menos uma alteração face à estirpe de referência. ....	19
Tabela 4.5: Representação dos polimorfismos identificados nos <i>loci pks15-1</i> em <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> .....	20
Tabela 4.6: Total de alterações registradas nas sequências aminoacídicas deduzidas de <i>pks15</i> e <i>pks1</i> ou presentes na base de dados NCBI, analisadas por domínio, para as estirpes <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> . ....	20
Tabela 4.7: Previsão <i>in silico</i> da estrutura tridimensional das proteínas Pks15 e Pks1 com base em pesquisa de homologia usando a ferramenta Phyre2. ....	22
Tabela 4.8.: Valores de R <sub>f</sub> registrados durante a análise por TLC dos lípidos celulares obtidos durante o crescimento em condições selecionadas. ....	38
Tabela A7.1 - Lista de sequências nucleotídicas e aminoacídicas utilizadas na análise bioinformática de polimorfismos do genes <i>pks15</i> e <i>pks1</i> .....	47
Tabela A7.2. Dados e características genotípicas das estirpes de campo de <i>M. bovis</i> estudadas.....	49
Tabela A.7.3 - Lista de <i>primers</i> utilizados no presente trabalho.....	49
Tabela A.7.4: Informações relativas às condições reacionais e condições de PCR utilizadas no presente trabalho.....	50
Tabela A.7.5. - Composição e modo de preparação dos meios de cultura, tampões e soluções utilizados no presente trabalho.....	50



## Resumo

A tuberculose é uma doença infecciosa de etiologia bacteriana, considerada uma das doenças infecciosas com maior impacto na população humana: em 2014, foi diagnosticada em 9,6 milhões de pessoas, tendo provocado a morte a 1,5 milhões. Os dados epidemiológicos apontam ainda para que cerca de um terço da população mundial esteja colonizada com o agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis*, num quadro paradigmático de tuberculose latente, que ao reativar, despoleta uma infeção ativa com exacerbação de lesões e disseminação do microrganismo. Outro dos grandes focos de preocupação para as autoridades de saúde pública é a emergência e resistência deste agente aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento. Estima-se que, em 2014, 480.000 pessoas terão desenvolvido TB multirresistente (MDR-TB), dos quais 9,7% dos casos terão sido classificados como extremamente resistentes (XDR-TB).

O género *Mycobacterium* inclui atualmente mais de 170 espécies distintas e pode ser dividido em dois grandes grupos: micobactérias de crescimento lento, como os agentes etiológicos da tuberculose bovina e humana, respetivamente *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*); e micobactérias de crescimento rápido, como *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*). As micobactérias de crescimento lento são geralmente associadas a uma patogenia complexa, influenciada por múltiplos fatores, entre eles o seu genótipo e o do hospedeiro, e por fatores ambientais, exemplificadas pelos casos de tuberculose causada pelos agentes etiológicos da tuberculose humana e animal, que se inserem no designado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC).

A abundância de ácidos micólicos e lípidos na parede celular é uma característica das espécies do género *Mycobacterium*, que apresentam uma superfície de consistência serosa e hidrofóbica. Num número limitado de espécies, na sua maioria patogénicas para o Homem, entre os lípidos expostos na superfície da parede celular encontram-se glicolípidos fenólicos (PGL) e dimicocerosatos de ftiocerol (DIMs). A maioria dos genes necessários à sua biossíntese estão localizados no *locus* DIM+PGL, e incluem os genes *fadD26*, *ppsA-E*, *fadD28*, *pks15*, *pks1* e *fadD29*. A proteína a sintetase de poliquétidos Pks15-1 é crucial na produção de PGL, uma vez que na sua ausência não existe produção de PGL, com consequências associadas ao nível de: (i) impermeabilidade da parede celular; (ii) interferência com o processo de fagocitose; (iii) mecanismos de defesa contra stresses oxidativo e nitrosativo; e, teoriza-se, à capacidade de formar comunidades de células organizadas no interior de uma estrutura rica em ácidos micólicos e lípidos.

Os atuais modelos de persistência micobacteriana descrevem a existência de populações de células latentes, que podem ser reativadas perante um quadro de imunossupressão por parte do hospedeiro. O fenótipo descrito para casos clínicos de tuberculose partilha similaridades com características exibidas por comunidades em biofilmes bacterianos, nomeadamente: elevada percentagem de células persistentes, elevada resistência a compostos antimicrobianos, e provável variação fenotípica de uma subpopulação heterogénea de células.

Já foi demonstrada *in vitro* a capacidade de *M. tuberculosis* formar películas reticuladas na interface líquido-ar. Contudo, desconhece-se a capacidade deste agente e de outras espécies, como *M. bovis*, de formar estas estruturas *in vivo*. No entanto, já foi avançada a hipótese de que *M. tuberculosis* é capaz de formar comunidades organizadas em biofilme ao abrigar células tolerantes a drogas no interior de uma estrutura rica em ácidos micólicos livres, necessitando de um ambiente e programa genético específicos. Os estudos experimentais focados neste aspeto da fisiologia micobacteriana são ainda muito escassos, em parte pelas dificuldades associadas ao estudo destes microrganismos, quer pelas características fisiológicas inerentes e crescimento fastidioso, quer pela ameaça biológica que representam, nomeadamente em termos de saúde do operador e de outros membros do laboratório, sendo necessário o manuseamento das culturas bacterianas em laboratórios de biossegurança de nível 3 (BSL-3).

Neste trabalho, colocou-se a hipótese de que a exposição de micobactérias a limitações de oxigénio e aos stresses nitrosativo e oxidativo presentes nos granulomas durante o processo de infeção poderia desencadear uma resposta de crescimento em biofilme e quais seriam as potenciais consequências dessa exposição sobre a produção de PGL.

Pretendeu-se assim, em primeiro lugar, explorar abordagens de genómica comparativa para compreender a microdiversidade de alvos biológicos selecionados com base no seu potencial envolvimento no processo de formação de biofilmes e, subjacentemente, caracterizar a sua funcionalidade fisiológica aparente; estabelecer as condições ambientais que promovem a formação de biofilmes *in vitro* por micobactérias patogénicas; caracterizar o efeito exercido por essas condições na fisiologia e metabolismo micobacterianos, bem como na composição de lípidos da parede celular; explorar o perfil transcricional em condições selecionadas para investigar a base molecular do crescimento em biofilmes, iniciando-se também a construção de um mutante de eliminação com o objetivo de inferir acerca da função *in vivo* do gene alvo e a possível associação a formação de biofilmes.

Da caracterização dos genes *pks1* e *pks15* que codificam Pks15-1, verificou-se, por pesquisa de homologia nas bases de dados, que as subunidades correspondentes aos seus produtos podem estar associadas a duas grelhas de leitura aberta (ORF), ou apenas a uma, dependendo da estirpe, sendo ainda sugerida a presença de seis domínios funcionais: KS (cetoacilsintetase), formado a partir do transcrito do gene *pks15*; AT (acilotransferase), DH (desidratase) ER (enoilredutase), KR (cetoredutase) e ACP (proteína transportadora de grupos acilo), formados a partir do transcrito do gene *pks1*.

Da análise comparativa de 142 genomas de *M. tuberculosis* e *M. bovis* recolhidos das bases de dados internacionais, verificou-se que, de entre os vários domínios dos genes *pks1* e *pks15*, KR apresenta maior acumulação de polimorfismos, sendo, por outro lado, KS o domínio com alterações mais frequente na maioria das estirpes estudadas. A região intergénica entre *pks15* e *pks1* regista vários polimorfismos que podem provocar a disrupção da grelha de leitura e impedir a transcrição de *pks1* em alguns isolados, sugerindo transcrição diferencial destas duas ORFs nos isolados clínicos em circulação. A história microevolutiva de ambos os genes

parece também ser diferente nos isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis* em estudo, verificando-se maior conservação das sequências nucleotídicas e aminoacídicas em *M. bovis*, enquanto cerca de metade das sequências nucleotídicas de *M. tuberculosis* analisadas apresentam elevado número de polimorfismos, resultante da acumulação de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), inserções e eliminações. Alguns dos polimorfismos detetados resultam em substituições aminoacídicas semi- ou não-conservativas, conduzindo, por vezes, à alteração da grelha de leitura, com a produção de um codão *STOP* prematuro que impede a produção do transcrito completo do gene *pks1* e leva à produção de uma proteína truncada, com ausência de vários dos presumíveis domínios estruturais.

A análise da resposta fisiológica de micobactérias selecionadas (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. bovis* BCG Tokyo, e quatro estirpes de campo de *M. bovis* (I, II, III, IV)) perante diferentes condições ambientais que mimetizam o ambiente no hospedeiro, tais como: stresse oxidativo, induzido por peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido ascórbico e metil de viologénio (MV); stresse nitrosativo, gerado por nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>); e a presença de colesterol, permitiu concluir que, numa concentração de 25 mM, NaNO<sub>2</sub> provoca inibição da formação de biofilmes e uma diminuição média da taxa de sobrevivência na ordem dos 50%. Relativamente aos compostos que causam stresse oxidativo, destaca-se sobretudo o efeito contrastante provocado pela presença de ácido ascórbico no crescimento e formação de biofilmes de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG Tokyo e *M. bovis* II, assim como a ação conjunta exercida por ácido ascórbico com metil de viologénio, que potencia a taxa de crescimento e promove a formação de biofilmes para valores largamente superiores aos obtidos durante o crescimento em condições controlo, o que sugere que a formação de biofilmes poderá ser desencadeada como resposta ao stresse. A análise da associação entre a formação de biofilmes por micobactérias patogénicas selecionadas, crescidas sob diferentes condições ambientais, e o perfil dos lípidos membranares produzidos nessas condições, com especial enfoque para o PGL, aferido por cromatografia em camada fina, também permitiu verificar que a estrutura química e quantidade relativa dos lípidos celulares formados varia com o tipo de stresse imposto.

Relativamente à análise transcricional dos genes *pks1* e *pks15*, cuja expressão relativa foi quantificada em condições de stresse por recurso a RT-qPCR, verificou-se que esta se encontra aumentada, quer na presença de stresse nitrosativo, quer oxidativo, mais evidente na presença de metil de viologénio (2,69 vezes em *pks15* e 4,37 vezes em *pks1*) e de ácido ascórbico (1,40 vezes em *pks15* e 1,63 vezes em *pks1*).

A construção de um mutante de eliminação do gene *pks1* por uma estratégia de transdução especializada, com vista a analisar e avaliar o papel do gene *pks1* na fisiologia de micobactérias e comparar o efeito direto da presença/ausência deste na resposta a diferentes condições ambientais e na formação de biofilmes não foi concluída até ao final do presente trabalho, tendo-se no entanto completado a construção de um substrato de troca alélica (AES) para o fim pretendido.

Os resultados obtidos no âmbito da presente dissertação permitem inferir uma história evolutiva contrastante para os genes *pks15* e *pks1* entre os dois ecótipos do MTC, com

estirpes clinicamente relevantes e atualmente em circulação a apresentarem várias alterações disruptivas da grelha de leitura. Considera-se, assim, a possibilidade de um cenário de pseudogenização destas ORFs em estirpes de *M. tuberculosis*, não se descartando no entanto a possibilidade dos produtos destes genes exercerem uma atividade regulatória e/ou uma função biológica importante *in vivo*.

Considerando os perfis fisiológicos e transcricionais obtidos e exibidos pelas micobactérias estudadas neste trabalho quando expostas a condições hostis à homeostasia bacteriana, reforça-se a possibilidade das micobactérias adotarem uma resposta fisiológica de formação de biofilmes como resposta ao stresse e de a sintetase de poliquétidos *pks15-1* estar associada a processos biológicos relacionados com a produção e maturação de estruturas características de biofilmes, estando simultaneamente sujeita a pressão evolutiva purificante. As evidências reunidas neste trabalho poderão futuramente auxiliar ao desenvolvimento de estudos experimentais focados nos aspetos da latência e persistência da infeção das bactérias do MTC nos respetivos hospedeiros.

**Palavras-chave:** Complexo *Mycobacterium tuberculosis*; biofilmes; *pks1*; *pks15*; glicolípidos fenólicos

## Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease of bacterial aetiology with relevant socioeconomic aspects, considering the great impact upon the human population: solely in 2014, 9,6 million new TB cases were reported worldwide with 1,5 million of TB-related deaths. It has also been suggested that about one third of the world population is asymptotically colonized with the aetiological agent, *Mycobacterium tuberculosis*. This latent colonization is considered a TB hallmark, which, in cases of immune downfall triggers an active infection with exacerbating lesions and dissemination of the bacilli. Special attention is also given to TB due to the recent increase in the number of antibiotic-resistant TB cases seen upon treatment. It is estimated that, in 2014, nearly 480.000 people developed multidrug-resistant TB (MDR-TB), of which 9,7% were classified as extensively drug-resistant (XDR-TB).

The *Mycobacterium* genus includes more than 170 different species and may be divided into two large groups: slow-growing mycobacteria, such as the aetiological agents of cattle and human TB, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) and *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) respectively, and fast-growing mycobacteria, such as *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*). Slow-growing tuberculous mycobacteria are usually associated with a complex pathogenesis influenced by multiple factors, including genomic traits of both aetiological agent and host, combined with environmental factors, exemplified by cases of TB caused by human and cattle agents, which are grouped in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC).

The abundance of cell wall lipids and mycolic acids is characteristic of species of this genus, which exhibit a hydrophobic surface with a serous consistency. In a limited number of species, mostly pathogenic to man, among exposed lipids on the cell wall, we find phenolic glycolipids (PGLs). Most of the genes necessary for PGL biosynthesis are located at the DIM + PGL locus, and include *fadD26*, *PPSA-E*, *fadD28*, *pks15*, *pks1*, and *fadD29*. The *pks15-1* product is crucial for PGL production, since in its absence there is no PGL production, with associated consequences in: (i) cell wall impermeability; (ii) interference with the phagocytosis process; (iii) defence mechanisms of the agent against oxidative and nitrosative stresses encountered upon entry into the human/host body; and the (still theorized) ability to construct organised communities of cells within a rich secreted layer of lipids and mycolic acids.

Current models of mycobacterial persistence describe the existence of latent cell populations, which may reactivate upon host immunosuppression. The described phenotype of clinical TB cases shares similar characteristics with bacterial biofilm communities, namely: high proportion of persisting cells, augmented resistance to antimicrobial agents, and probable phenotypic variation of a heterogeneous subpopulation of cells.

It has been shown that *in vitro* cultures of *M. tuberculosis* can assemble biofilm structures at the liquid-air interface. However, it is still unknown whether this species and others (such as *M. bovis*), have the ability to form these structures *in vivo*. Nevertheless, it has been hypothesized that, when deployed by specific environment and genetic programs, *M. tuberculosis* is able to form organised communities exhibiting drug tolerance within a structure that is rich in free mycolic acids. Experimental studies focused on biofilm assembly and

mycobacterial physiology are still sparse, in part due to difficulties associated with the study of mycobacteria, with stringent physiological demands, slow growth and because of the biological threat they pose, particularly in terms of the operator's and other lab members' health; as such, experimental work with strictly pathogenic mycobacteria must be performed in a level 3 biosafety laboratory (BSL-3).

In the current dissertation, we placed the possibility that exposure of mycobacterial cells to stresses found inside the host, such as nitrosative and oxidative stress, which are present in TB granulomas, may trigger a biofilm-type response and also affect PGL production. In a first stage, the comparative genomics of selected biological targets were explored, considering their apparent involvement potential in biofilm assembly and, subsequently, their apparent physiological function was characterised; later on, the environmental conditions that promote *in vitro* biofilm formation by pathogenic mycobacteria were established; the physiological and metabolic responses of selected mycobacteria, as well as lipid composition of the cell wall, were characterized in these conditions. The next steps included the characterization of the transcriptional profile of selected genes from cells grown in specific conditions to investigate the molecular basis of biofilms, and the construction of a *knock-out* mutant strain for a selected target gene, in order to infer its *in vivo* function and possible association with biofilm assembly. However, this last part was not fully completed during the current dissertation.

The *pks1* and *pks15* genes, corresponding to one or two possible Open Reading Frames (ORF) depending on the strain, code for the polyketide synthetase Pks15-1 which possesses six functional domains: KS (ketoacylsynthase), formed from *pks15*; AT (acyltransferase), DH (dehydratase) ER (enoylreductase), KR (ketoreductase) and ACP (acyl carrier protein), formed from *pks1*.

Comparative analysis of 142 *M. tuberculosis* and *M. bovis* genomes collected from *Genbank* evidenced the accumulation of polymorphisms at the various domains of *pks1* and *pks15* genes, with a greater accumulation of genomic variation within the KR domain, while KS domain exhibited variations that were more frequently shared among studied strains. The intergenic region between *pks15* and *pks1* presents several polymorphisms that may lead to disruption of the reading frame and prevent transcription of *pks1*, suggesting differential transcription of these two ORFs in clinical isolates that are currently in circulation. The microevolutionary history of both genes seems to be different considering *M. bovis* and *M. tuberculosis*, depicting greater genomic and aminoacyl conservation in *M. bovis* strains, while approximately half of the nucleotide sequences of the analysed *M. tuberculosis* strains show high number of polymorphisms, due to accumulation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), insertions and deletions. Some of the detected variations result in semi- or non-conservative aminoacyl substitutions, which could lead to frameshifts and/or formation of premature STOP codons, thus preventing assembly of a full *pks1* transcript and leading to a truncated protein with absence of several presumed structural domains.

Analysis of the physiological responses of selected mycobacteria (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. bovis* BCG Tokyo and four *M. bovis* field strains (I, II, III, IV) against different

environmental conditions mimicking host environment, such as (i) oxidative stress, induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ascorbic acid or methyl viologen; (ii) nitrosative stress caused by sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>); (iii) and cholesterol presence, led us to conclude that, at 25 mM, NaNO<sub>2</sub> causes inhibition of biofilm formation and a mean decrease of survival rate to approximately 50%. In regard to compounds causing oxidative stress, there was a remarkable contrasting effect caused by ascorbic acid on growth characteristics and parameters and on biofilm formation by *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG Tokyo and *M. bovis* II, as well as the one caused by joint action of ascorbic acid with methyl viologen, which enhances the growth rate and promotes biofilm formation to substantially higher values than in control conditions, therefore suggesting that biofilm formation may be triggered by the bacterial population to cope with imposed stress. Association between biofilm formation of selected pathogenic mycobacteria grown under different environmental conditions, along with the profile of membrane lipids (with particular focus on the PGL) assessed by thin layer chromatography, evidenced that the chemical structure and the relative amount of cellular mycolipids varies with imposed stress.

Regarding the transcriptional analysis of *pkgs1* and *pkgs15*, whose relative expression in cells grown under stress conditions was quantified by RT-qPCR, results show several fold increase under nitrosative and oxidative stress, namely in the presence of methyl viologen (2,69 times in *pkgs15* and 4,37 times in *pkgs1*) and ascorbic acid (1,40 times in *pkgs15* and 1,63 times in *pkgs1*).

The construction of a *pkgs1* deletion mutant by specialised transduction was initiated in order to analyse and evaluate the direct role of *pkgs1* in mycobacteria physiology and to compare the effect of its presence/absence in response to several environmental conditions and biofilm assembly. This part of the work was not fully concluded in the present dissertation. However, assembly of the allelic exchange substrate (AES) was successfully completed.

The results obtained in the present study allow us to infer a contrasting evolutionary story for *pkgs15-1* between the two ecotypes of MTC, with clinically relevant strains that are currently in circulation showing accumulation of several disrupting genomic variations, potentially leading to a non-functional protein. It is therefore hypothesized the possibility for a pseudogenization scenario in *M. tuberculosis* strains, yet we cannot discard the possibility for these gene products to exert a relevant *in vivo* function in the mycobacteria infection pathway.

All results considered, the possibility of mycobacteria adopting a biofilm-like response to cope with deleterious conditions is reinforced, as well as the association of *pkgs15-1* to the biological processes related to the production and maturation of biofilm-characteristic structures. Subsequent studies build on these trends may shed light into the latency and persistence phenotypes of TB, which are key hallmarks of this socioeconomically-relevant infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* Complex; biofilms; *pkgs1*; *pkgs15*, phenolglycolipids

## Abreviaturas e acrónimos

As abreviaturas abaixo apresentadas foram baseadas na lista disponibilizada pelo Journal of Biological Chemistry.

**OMS** – Organização Mundial de Saúde.

**OIE** – do inglês *World Organisation for Animal Health*. Tradução: Organização Mundial para a Saúde Animal.

**INIAV** – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

**EFSA** – do inglês *European Food Safety Authority*. Tradução: Autoridade Europeia de Segurança Alimentar.

**NCBI** – do inglês *National Center for Biotechnology Information*. Tradução: Centro Nacional para a Informação da Biotecnologia.

**M. tuberculosis** – *Mycobacterium tuberculosis*.

**M. bovis** – *Mycobacterium bovis*.

**M. smegmatis** – *Mycobacterium smegmatis*.

**MTC** - do inglês *Mycobacterium Tuberculosis Complex*. Tradução: complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

**TB** – Tuberculose.

**bTB** – do inglês *bovine tuberculosis*. Tradução: tuberculose bovina.

**BCG** – do inglês *Bacillus Calmette–Guérin*. Tradução: Bacilo Calmette–Guérin.

**MDR-TB** – do inglês *Multi Drug Resistance tuberculosis*. Tradução: Tuberculose provocada por estirpes multirresistentes a drogas.

**XDR-TB** – do inglês *Extremely Drug Resistance Tuberculosis*. Tradução: Tuberculose provocada por estirpes extremamente resistentes a drogas.

**BAAR** – bacilo álcool-ácido resistente.

**LB** – meio Luria-Bertani.

**7H9** – meio Middlebrook 7H9.

**7H9Na** – meio Middlebrook 7H9 suplementado com piruvato de sódio.

**7H10** – meio Middlebrook 7H10.

**7H10Na** – meio Middlebrook 7H10 com piruvato de sódio.

**ADS** – do inglês *Albumin Dextrose Sodium*. Tradução: dextrose de albumina sódica.

**NAD** – do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*. Tradução: Dinucleótido de nicotinamida e adenina.

**NADPH** – do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*. Tradução: Fosfatase de dinucleótido de nicotinamida e adenina.

**ATP** – do inglês *Adenosine Triphosphate*. Tradução: Adenosina Trifosfato.

**CoA** – Coenzima A.

**ORF** – do inglês *Open Reading Frames*. Tradução: fase de leitura aberta.

**PI3P** – do inglês *Phosphatidylinositol 3-Phosphate*. Tradução: fosfatidilinositol 3-fosfato.

**NaNO<sub>2</sub>** – nitrito de sódio.

**MV** – metil de viologénio.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogénio.

**O<sub>2</sub>** – oxigénio.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** — aniões superóxido.

**MgCl<sub>2</sub>** – cloreto de Magnésio.

**Fe** – ferro.

**NO** – óxido nítrico.

**ROI** – do inglês *Reactive Oxygen Intermediates*. Tradução: espécies reativas de oxigénio.



**iNOS** – do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*. Tradução: óxido nítrico sintetase induzível.

**RNIs** – do inglês *Reactive Nitrogen Intermediates*. Tradução: espécies reativas de azoto.

**G** – do inglês *Glycine*. Tradução: Glicina.

**R** – do inglês *Arginine*. Tradução: Arginina.

**P** – do inglês *Proline*. Tradução: Prolina.

**S** – do inglês *Serine*. Tradução: Serina.

**W** – do inglês *Tryptophan*. Tradução: Triptofano.

**M** – do inglês *Methionine*. Tradução: Metionina.

**C** – do inglês *Cystein*. Tradução: Cisteína.

**V** – do inglês *Valine*. Tradução: Valina.

**p-HB** – do inglês *p-Hydroxybenzoic*. Tradução: *p*-hidroxibenzoil.

**proteína TACO** – do inglês *Tryptophan-Aspartate containing Coat Protein*. Tradução: proteína de revestimento que contém triptofano-aspartato.

**PAMP** – do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*. Tradução: padrões moleculares associados a patógenos.

**PRR** – do inglês *Pattern Recognition Receptors*. Tradução: receptores de reconhecimento de padrões.

**CFP-10** – do inglês *Culture Filtrate Protein 10*. Tradução: proteína 10 de filtrado de cultura.

**ESAT-6** – do inglês *Early Secretory Antigenic 6 kDa Target*. Tradução: alvo antigénico secretor precoce de 6kDa.

**DosR** – do inglês *DORMANCY Survival Regulator protein*. Tradução: proteína reguladora de sobrevivência em dormência.

**FadD** – do inglês *Fas-Associated protein with Death Domain*. Tradução: Proteína associada a Fas com domínio de morte.

**PpsA-E** – do inglês *PhenolPthiocerol Synthesis type-I polyketide synthase pps A, B, C, D or E*. Tradução: sintetase de poliquétidos de tipo I A, B, C, D ou E, para a síntese de fenolftiocerol.

**PIM** – do inglês *Phosphatidylinositol Mannosides*. Tradução: manósidos de fosfatidilinositol.

**PGL** – do inglês *Phenolic Glycolipid*. Tradução: glicolípidos fenólicos.

**DIMs** – do inglês *Phthiocerol Dimycocerosates*. Tradução: dimicoserosatos de ftiocerol.

**KS** – do inglês *Ketoacyl-Synthase*. Tradução: Sintetase de beta-cetoacilo.

**AT** – do inglês *Acyltransferase*. Tradução: aciltransferase.

**DH** – do inglês *Dehydratase*. Tradução: desidratase.

**ER** – do inglês *Enoylreductase*. Tradução: enoilredutase.

**KR** – do inglês *Ketoreductase*. Tradução: cetoredutase.

**ACP** – do inglês *Acyl Carrier Protein*. Tradução: proteína transportadora de grupos acilo.

**LM** – do inglês *Lipomannan*. Tradução: lipomanano.

**LAM** – do inglês *Lipoarabinomannan*. Tradução: lipoarabinomanano.

**ManLAM** – do inglês *Mannosylated Lipoarabinomannan*. Tradução: lipoarabinomanano manosilado.

**PILAM** – do inglês *Lipoarabinomannan Phosphoinositide residues capped*. Tradução: lipoarabinomanano fosfoinosítido-capped.

**p-HBA** – do inglês *p-HydroxyBenzoic Acid*. Tradução: Ácido *p*-hidroxibenzóico.

**PKS** – do inglês *Polyketide synthases*.

Tradução: sintases de poliquétidos.

**Mas** – do inglês *Mycocerosic acid*

*Synthase*. Tradução: sintetase de ácidos micocerósicos.

**NOX** – do inglês *NADPH oxidase*.

Tradução: NADPH oxidase.

**SNP** – do inglês *Single Nucleotide*

*Polymorphism*. Tradução: polimorfismo de nucleótido único.

**ELIM** – Eliminação.

**IN** – Inserção.

**RvD** – do inglês *Related Deletions*.

Tradução: Regiões de eliminação.

**AES** – do inglês *Allelic Exchange*

*Substrates*. Tradução: substratos de troca alélica.

**RD** – do inglês *Regions of Difference*.

Regiões de Diferença.

**μM** – Micromolar.

**mM** – Milimolar.

**μl** – Microlitro.

**ml** – Mililitro.

**l** – Litro.

**ng** – Nanograma.

**g** – Grama.

**DO** – Densidade Ótica.

**DO<sub>600 nm</sub>** – Densidade ótica no comprimento de onda 600 nm.

**Abs** – do inglês *Absorbance*. Tradução: Absorvância.

**Abs<sub>590 nm</sub>** – Absorvância num comprimento de onda 590 nm.

**Abs<sub>600 nm</sub>** – Absorvância num comprimento de onda 600 nm.

**n** – número total de experiências/observações.

**kb** – kilobase.

**pb** – pares de base.

**UFC** – do inglês *Colony-Forming Unit*.

Tradução: unidade formadora de colônia.

**UFC/ml** – do inglês *Colony-Forming Unit per milliliter*. Tradução: unidades formadoras de colônias por ml.

**μmax** – taxa de crescimento específica máxima.

**r** – coeficiente de correlação.

**s** – segundo.

**min** – minuto.

**h** – hora.

**h<sup>-1</sup>** – unidade hora.

**sem** – semana.

**rpm** – rotações por minuto.

**PCR** – do inglês *Polymerase Chain*

*Reaction*. Tradução: Reação em Cadeia de Polimerase.

**qPCR** – do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*. Tradução: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa.

**RT-qPCR** – do inglês *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*. Tradução: Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa.

**Ct** – do Inglês *Threshold Cycle*. Tradução: ciclo limite.

**TLC** – do inglês *Thin-Layer*

*Chromatography*. Tradução: cromatografia de camada fina.

**Phyre2** – do inglês *Protein*

*Homology/analogy Recognition Engine*. Tradução: motor de reconhecimento de homologia de proteínas.

**STITCH** – do inglês *Search Tool for Interactions of Chemicals*. Tradução:

ferramenta de pesquisa para interações entre químicos.

**BLAST** – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*.

**FASTA** – do inglês *Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm*.

**CDD** – do inglês *Conserved Domain Database*

## 1. Introdução

### 1.1. Tuberculose humana (TB)

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de etiologia bacteriana causada por bactérias do género *Mycobacterium*, anteriormente designadas por bacilos de Koch. Apesar da apresentação mais comum da doença em humanos ser a forma pulmonar, pode afetar qualquer órgão (tuberculose extrapulmonar) ou disseminar-se genericamente pelo organismo por via hematogénica ou linfática (tuberculose miliar). É considerada uma das doenças infecciosas com maior impacto na população humana, tendo sido diagnosticada em 9,6 milhões de pessoas e provocado a morte de 1,5 milhões em 2014. Os relatórios da Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem ainda que aproximadamente um terço da população mundial esteja colonizada com o agente da tuberculose, num quadro paradigmático de tuberculose latente que poderá potencialmente reativar em condições de imunossupressão do hospedeiro, despoletando infeção ativa com exacerbação de lesões e disseminação do agente etiológico<sup>1</sup>.

Apesar dos indicadores epidemiológicos mundiais terem evoluído positivamente nos últimos anos, com uma diminuição notável (47%) dos índices de mortalidade por tuberculose a ser registada entre 1990 e 2015, esta tendência tem sido ameaçada pela emergência de resistência do agente etiológico aos antibióticos utilizados no tratamento. Só em 2014, a OMS estimou que 480.000 pessoas teriam desenvolvido TB multirresistente (MDR-TB), sendo 9,7% dos casos detetados classificados como extremamente resistentes (XDR-TB)<sup>1</sup>.

### 1.2. Tuberculose animal

A tuberculose animal afeta várias espécies, incluindo espécies domésticas como bovinos, e é endémica em várias regiões do mundo, sendo um problema de saúde animal e um potencial problema de saúde pública e contribuindo ainda para grandes perdas na indústria leiteira e de comércio de carnes, provocando também limitações ao comércio de animais e produtos derivados<sup>2,3,4,5</sup>. É, por isso, considerada uma doença de importância mundial pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (Fig. 1.1).

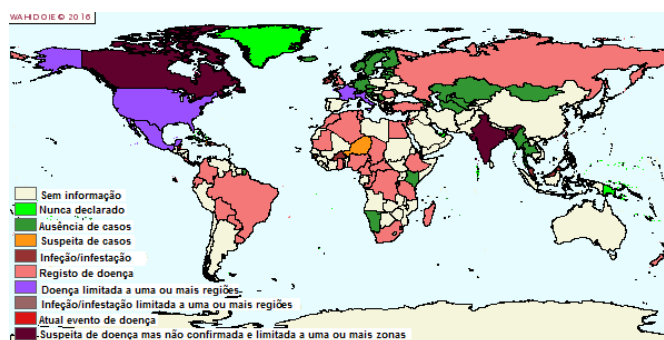


Figura 1.1: Distribuição geográfica dos casos de tuberculose bovina declarados por país à OIE, entre Julho e Dezembro de 2015. Adaptado de WAHID<sup>6</sup>.

A maioria dos países desenvolvidos, incluindo Portugal, tem implementado programas de erradicação da doença nos bovinos<sup>4,7,8</sup>. Em Portugal, o plano de erradicação da TB inclui o rastreio regular dos efetivos bovinos e abate dos animais positivos, testes de pré-movimentação, bem como a declaração obrigatória dos casos confirmados à Autoridade

Veterinária Nacional e à Comissão Europeia<sup>9</sup>. Apesar dos progressos registados, verificou-se em 2010 um agravamento da incidência e prevalência da doença (0,74% e 0,9% respetivamente)<sup>9</sup>, tendo-se acumulado também durante este período evidências da transmissão entre espécies domésticas e selvagens<sup>10</sup>, uma vez que a genotipagem dos isolados de espécies domésticas e selvagens da mesma área geográfica demonstra a existência de estirpes comuns<sup>11</sup>.

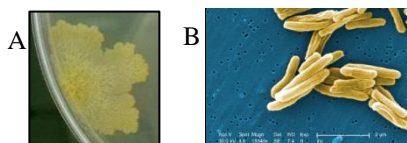
Apesar de existirem muitas espécies suscetíveis à infeção, nem todas transmitem horizontalmente o agente etiológico<sup>12</sup> sendo que, em 2009, o relatório publicado pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) identificou o veado (*Cervus elaphus*), o texugo-europeu (*Meles meles*) e o javali (*Sus scrofa*) como as principais espécies responsáveis pela manutenção da tuberculose na fauna selvagem em algumas regiões do mundo<sup>13</sup>. A existência de reservatórios na fauna selvagem e potencial transmissão a espécies domésticas tem dificultado o sucesso dos programas de erradicação<sup>4,5,14-17</sup>.

Nos animais, a transmissão intra- e inter-espécie está associada à excreção da bactéria nas secreções respiratórias, fezes, leite e, menos frequentemente, nas secreções vaginais e sémen, sendo a principal via de contágio a via aérea pela inalação de aerossóis<sup>2</sup>, seguindo-se a ingestão de produtos contaminados provenientes de animais infetados e o manejo em zonas de pastagem contaminada<sup>5</sup>. A dose mínima infecciosa efetiva é muito reduzida, estando documentado que uma unidade formadora de colónia (UFC) (que contém entre 6 a 10 bacilos viáveis) é suficiente para que o microrganismo se instale e provoque a doença<sup>20</sup>. A transmissão ao Homem ocorre sobretudo pela ingestão de produtos lácteos não pasteurizados, podendo também afetar indivíduos que trabalham diretamente com animais infetados, nomeadamente médicos veterinários, caçadores e trabalhadores de matadouro<sup>19,20</sup>.

### 1.3. *Mycobacterium* spp.

#### 1.3.1. Características gerais de um género bacteriano ímpar

O género *Mycobacterium* é o único membro da família Mycobacteriaceae, pertencente à ordem Actinomycetales, classe Actinobacteria, filo Actinobacteria, domínio Bacteria e inclui atualmente mais de 170 espécies distintas<sup>21,22</sup>. Os microrganismos deste género apresentam morfologia de bastonetes (entre 0,2-0,6 µm largura e 1,0-10 µm comprimento), com ligeira curvatura ou sem curvatura, não esporulados e não móveis<sup>20,23</sup> (Fig. 1.2). O metabolismo das espécies do género *Mycobacterium* é considerado aeróbio, embora esteja descrita a possibilidade de crescimento em condições de anaerobiose<sup>24</sup>; têm uma temperatura de crescimento ótima compreendida entre 30 °C e 45 °C e utilizam diversos compostos como fonte de carbono<sup>23</sup>, assimilando amónia como fonte de azoto<sup>20</sup>. Estas bactérias apresentam elevado teor G+C no seu genoma, que varia entre 62 e 70%, consoante a espécie<sup>25</sup>.



**Figura 1.2: Morfologia de colónias de *Mycobacterium* spp.** A: Colónia de *M. bovis* em meio sólido. Isolado crescido em 7H10 piruvato, a 37 °C, durante aproximadamente três meses. B Imagem de microscopia eletrónica, ampliação 15549x, *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado de Carr, 2006<sup>26</sup>.

A abundância de ácidos micólicos na parede celular é uma característica das espécies do género *Mycobacterium*, ímpar entre procariotas<sup>20</sup>, e que é responsável pela eficiência da coloração de Ziehl-Neelsen na visualização microscópica das mesmas, uma vez que é a composição e estrutura da parede que promove a retenção do corante fucsina fenicada e impede a descoloração pela ação do álcool-ácido; deve-se então a estas propriedades a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR)<sup>12,20</sup>. Estas características únicas dificultam igualmente a coloração pelo método de Gram; no entanto, as micobactérias são consideradas (fracamente) Gram positivas<sup>12</sup>. É também devido à presença de ácidos micólicos na parede celular que os isolados de *Mycobacterium* spp. em meio sólido apresentam uma superfície de consistência serosa e hidrofóbica<sup>20</sup>. Outras considerações mais pormenorizadas sobre a natureza e relevância da parede celular de micobactérias são tecidas mais à frente nesta dissertação (ponto 1.4).

O género *Mycobacterium* pode ser dividido em dois grandes grupos: micobactérias de crescimento lento (período de crescimento superior a sete dias), como *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*); e micobactérias de crescimento rápido (crescimento até sete dias), como *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*)<sup>20, 25</sup>. Embora sejam conhecidas exceções, as micobactérias de crescimento rápido são habitualmente saprófitas e estão amplamente distribuídas em ambientes naturais, sendo raramente consideradas patogénicas para o Homem<sup>23,27</sup>, enquanto as de crescimento lento surgem geralmente associadas a doenças, tanto no Homem como noutras espécies animais<sup>23</sup>.

### **1.3.3. O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC)**

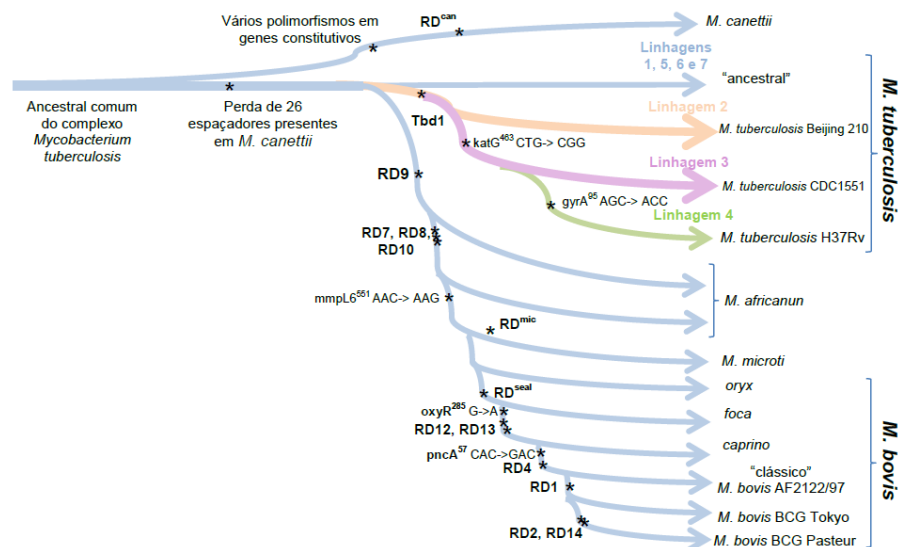
A maioria das espécies de crescimento lento do género *Mycobacterium* provoca síndromes clínicas semelhantes<sup>25</sup>, nomeadamente tuberculose em diferentes espécies animais, com a produção de lesões granulomatosas, caseosas ou calcificadas, e caracterizadas por infiltração linfocitária. Algumas destas espécies, particularmente as que causam tuberculose em mamíferos, estão agrupadas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), apresentando elevada homologia ao nível das sequências nucleotídicas do seu genoma (similaridade superior a 99,9%) e sequências idênticas dos genes que codificam para 16S rRNA, sendo também vulgarmente apelidadas de ecotipos<sup>21,28</sup>.

O MTC é atualmente constituído por sete espécies, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*<sup>21,29</sup> e *Mycobacterium caprae*<sup>30</sup>, cada uma apresentando tropismo para uma espécie hospedeira específica: *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii* por humanos; *M. microti* por roedores; *M. caprae* por caprinos; *M. pinnipedii* por mamíferos marinhos; e *M. bovis*, por bovinos e outras espécies. Contudo, a preferência por um hospedeiro não elimina a possibilidade das diferentes espécies infetarem outros hospedeiros, considerados hospedeiros acidentais<sup>21,31,32,33</sup>.

#### **1.3.3.1. Evolução e filogenia do complexo *Mycobacterium tuberculosis***

Os membros do MTC são distinguíveis, do ponto de vista genético, pela presença de inserções, eliminações e mutações pontuais ou polimorfismos de nucleótico único (SNPs) no

seu genoma (Fig. 1.3.)<sup>28,34</sup>. A análise da presença de 20 regiões variáveis, 14 regiões de diferença (RDs) e seis regiões de eliminação (RvD) tem permitido diferenciar os vários ecotipos, o estudo da evolução do complexo MTC e a inferência da filogenia dos seus membros<sup>28,35</sup>.



**Figura 1.3: Esquema proposto para a filogenia e evolução do MTC.** O esquema ilustra e esquematiza a presença ou ausência de eliminações sucessivas de regiões conservadas no genoma de várias estirpes, e de polimorfismos em cinco genes selecionados. As distâncias entre ramos podem não corresponder a diferenças filogenéticas aferidas com base noutras regiões do genoma. As setas laranja, roxa e verde representam as denominadas estirpes “modernas”, em que: laranja-> linhagem 2 / Leste Asiática, roxo-> Linhagem 3 / Asiática Central e Leste Africana, verde-> Linhagem 4-> Euro-Americana. Adaptado de Brosch *et al.*, 2002 e Brites & Gagneux, 2015<sup>28,36</sup>.

Analisando a sequência de alterações acumuladas ao nível do genoma da população de *M. bovis*, regista-se uma sucessão de eventos de eliminação de seções do genoma, com subsequente redução da diversidade genómica, decorrente da seleção de sub-ecotipos mais adaptados a hospedeiros específicos<sup>37</sup>. Os elementos contemporâneos da linhagem são *M. bovis* “clássico” e *M. bovis* Bacilo Calmette-Guerin (BCG) Tokyo / *M. bovis* BCG Pasteur. A base da divergência destes dois ramos é a eliminação da RD1, uma região que inclui nove genes, situados entre *Rv3870* e *Rv3879c*, que codificam para a proteína 10 de filtrado de cultura (CFP-10) e alvo antigénico secretor precoce de 6kDa (ESAT-6), proteínas altamente imunogénicas relacionadas com a virulência das estirpes patogénicas do MTC<sup>38,39,40</sup>.

#### 1.3.4. *M. bovis* – importância no contexto da saúde pública

Apesar de *M. bovis* ter como principal hospedeiro os bovinos<sup>25</sup>, é a espécie do MTC que apresenta uma maior gama de hospedeiros<sup>12, 20</sup>, incluindo mamíferos domésticos e selvagens, tais como cervídeos, suídeos e carnívoros, bem como o Homem<sup>28</sup>.

A tuberculose causada por *M. bovis* é uma zoonose importante, particularmente em países subdesenvolvidos<sup>41,42</sup>. Esta zoonose pode estar sub-diagnosticada, uma vez que o diagnóstico microbiológico se cinge ao isolamento do agente, sem identificação ou diferenciação subsequente, utilizando-se por vezes meios de cultura inadequados ao isolamento de *M. bovis* e/ou tempo de incubação insuficiente<sup>43</sup>.

#### 1.3.5. Etapas do processo de infecção de *Mycobacterium* spp.

##### 1.3.5.1. Da primoinfecção à latência

*M. bovis* e as demais espécies do MTC desenvolveram a capacidade de se adaptar ao

seu hospedeiro, sobrevivendo e proliferando no interior de macrófagos. Apesar de estimularem o sistema imunitário do hospedeiro, na maioria dos casos provocam uma infecção latente, podendo decorrer vários anos ou décadas até que a doença se manifeste na forma aguda<sup>20</sup>.

Durante a resposta imunitária inata, as micobactérias interagem com macrófagos e células dendríticas, seguindo-se a sua fagocitose exercida indiferenciadamente por macrófagos. Este processo implica a internalização das micobactérias em fagossomas, ocorrendo depois a fusão dos mesmos com lisossomas, formando-se o fagolisossoma e ocorrendo redução drástica do pH dentro do fagolisossoma para próximo de 5<sup>44-48</sup>. Contudo, *M. tuberculosis* e *M. bovis* conseguem inibir este processo de acidificação, impedindo a fusão do fagossoma com os lisossomas e mantendo o pH próximo de 6,4<sup>49</sup>, escapando à degradação celular e posterior apresentação de antígenos ao sistema imunitário<sup>50</sup>.

Algumas das estratégias descritas para travar este processo de fusão são a eliminação de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), um lípido sintetizado ao nível da membrana do fagossoma e associado à sua maturação<sup>50,51</sup>; a retenção da proteína de revestimento que contém triptofano-aspartato (TACO) na membrana do fagossoma, impedindo a sua internalização para o citoplasma e, conseqüentemente, a fusão entre o fagossoma e o lisossoma<sup>52</sup>; e encontra-se ainda descrita a libertação da proteína cinase G (PknG) por parte da micobactéria para o fagossoma, impedindo a fusão<sup>53</sup>. Os macrófagos ativados expressam a enzima fagócito NADPH oxidase (NOX2/gp91<sup>phox</sup>), que gera espécies reativas de oxigénio (ROIs) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), que produz espécies reativas de azoto (RNIs)<sup>54</sup>. As ROIs e RNIs podem ser bactericidas na medida em que interagem com moléculas orgânicas cruciais à sobrevivência da bactéria, tais como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono, inviabilizando-as<sup>54,55</sup>.

Durante a fagocitose, as subunidades de NADPH oxidase 2 (NOX2) associam-se num complexo enzimático que, ao utilizar NADPH citosólico, geram aniões superóxido ( $O_2^-$ ). Estes aniões, só por si, são tóxicos à bactéria, uma vez que levam: (i) à degradação de óxido nítrico (NO), diminuindo a sua biodisponibilidade; (ii) à formação de espécies tóxicas como peroxinitrito; (iii) ao azotamento de tirosinas e (iv) à alcalinização dos organelos intracelulares. Contudo, os aniões superóxido podem ainda formar peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), capaz de oxidar resíduos de cisteína, o que leva à inativação de tirosina-fosfatases e da formação de pontes dissulfeto, assim como à ativação de fatores de transcrição que participam em redes de regulação imprescindíveis à sobrevivência das micobactérias, bem como ativar GTPases, reagindo ainda com peroxidases ou oxidando inespecificamente componentes celulares<sup>54,56, 57</sup>. À medida que a resposta imunitária avança, forma-se um granuloma em redor do foco primário e dos macrófagos infetados, envolvidos por tecido de granulação, monócitos, plasmócitos e seus produtos secretados. O ambiente no interior do granuloma é pobre em oxigénio, rico em lípidos e proteínas, derivados de células mortas, e bactérias, tornando-se um ambiente hostil, caracterizado pela presença de stresse oxidativo, nitrosativo, hipóxia, elevada concentração de radicais livres e limitação de nutrientes. As micobactérias resistentes a estas condições ficam contidas no granuloma, sofrendo alterações fisiológicas e desencadeando um estado de



dormência, no qual podem permanecer durante décadas<sup>58</sup>. Os indivíduos saudáveis controlam o agente patogénico nesta fase, mas permanecem infectados de forma latente e, portanto, em risco de reativação ao longo da vida.

#### 1.3.5.2. Mecanismos genéticos associados à dormência microbiana

Fatores ambientais como hipóxia e a presença de espécies químicas como o monóxido de carbono ou o óxido nítrico desencadeiam a dormência de micobactérias, com indução de um estado não replicativo e redução drástica dos níveis metabólicos.

À luz do conhecimento atual, vários estudos sugerem que o sistema de transdução regulador de sobrevivência em dormência DosR/DosS/DosT é crucial no processo de latência de *M. tuberculosis*<sup>59</sup>. O regulão DosR é aparentemente crucial na adaptação e sobrevivência do microrganismo ao ambiente hipóxico, sendo ativado pelas histidina-cinases DosS e DosT, presentes ao nível da parede celular e que apresentam domínios sensores para moléculas oxidantes e carência de oxigénio, respetivamente<sup>59,60</sup>. Perante condições de hipóxia, DosT e DosS associam-se a moléculas de óxido nítrico e monóxido de carbono presentes no meio circundante, autofosforilando-se e, exercendo atividade de cinase, fosforilam o fator de transcrição DosR<sup>59,61</sup>. A fosforilação de DosR desencadeia respostas genética e fisiológica específicas na célula, induzindo o estado não replicativo. Já na presença de oxigénio (O<sub>2</sub>), DosT e DosS têm a sua atividade cinásica inibida por se encontrarem saturadas com O<sub>2</sub>, estando atualmente descrita a associação entre hipóxia e o fenótipo de latência em *M. tuberculosis*<sup>61</sup>.

Assim, perante um ambiente normalmente hostil a microrganismos, as bactérias do MTC adotam uma resposta coordenada, ativando vias metabólicas específicas, nomeadamente o metabolismo lipídico por utilização de ácidos gordos e triglicéridos<sup>62</sup>.

### 1.4. Relevância biológica da parede celular das micobactérias

#### 1.4.1. Características gerais

Ao nível estrutural, a membrana plasmática, encontra-se rodeada por uma sobreposição de camadas de macromoléculas covalentemente associadas: peptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos e manósidos de fosfatidilinositol (PIM), existindo igualmente ligações não covalentes entre lípidos e proteínas (Fig.1.4.1)<sup>63,64</sup>.

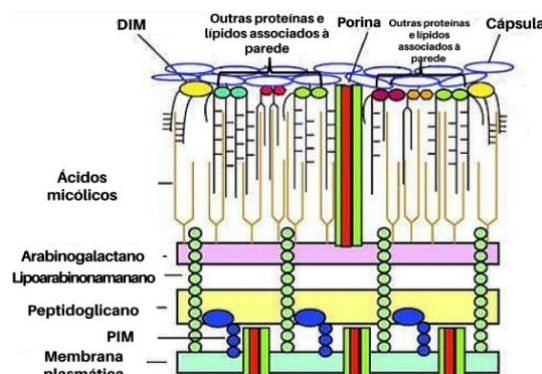


Figura 1.4: Representação esquemática da parede celular de micobactérias, com destaque para os lípidos de superfície. Adaptado de Ouellet H, Johnston JB, de Montellano PR. 2011<sup>64</sup>. Abreviaturas: PIM: manósideo de fosfatidilinositol; DIM, dimicocato de ftiocerol.

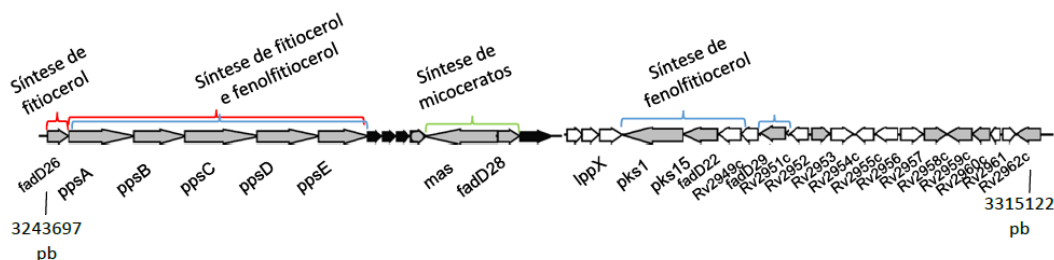
Os ácidos micólicos são lípidos complexos de elevada massa molecular que contribuem para a natureza hidrofóbica da superfície celular e limitam a difusão de nutrientes, o

que consequentemente contribui para a baixa taxa de crescimento destes microrganismos. Distribuem-se ao longo de uma camada espessa, onde estão ancorados em arabinogalactano, em conjunto com moléculas como lipomanano (LM), lipoarabinomanano (LAM) e lipoarabinomanano manosilado (ManLAM), no caso de micobactérias patogênicas, ou lipoarabinomanano fosfoinositido-*capped* (PILAM) em micobactérias não patogênicas<sup>64</sup>. ManLAM e LM, assim como os PIMs, apresentam propriedades imunomodulatórias importantes e distintas, sendo considerados fatores de virulência cruciais na patogenicidade do agente da tuberculose, variando quanto à estrutura, heterogeneidade, abundância e, consequentemente, virulência, entre as diferentes espécies do género *Mycobacterium*<sup>65</sup>.

#### 1.4.2. Características bioquímicas e via biossintética

A elevada concentração de lípidos torna a superfície das micobactérias hidrofóbica e resistente à ação da maioria dos detergentes, compostos antibacterianos e desinfetantes disponíveis<sup>63</sup>. Num número limitado de espécies, na sua maioria patogênicas para o Homem, incluindo *M. bovis*<sup>66,67</sup>, entre os lípidos expostos na superfície da parede celular encontram-se moléculas de duas famílias distintas: dimicocerosatos de ftiocerol (DIMs) e glicolípidos fenólicos (PGL), associados à impermeabilidade da parede celular; à interferência com o processo de fagocitose<sup>68,69</sup>; aos mecanismos de defesa contra stresses oxidativo e nitrosativo<sup>66</sup>; e, teoriza-se, à capacidade de formar biofilmes<sup>70</sup>.

A estrutura química de PGLs é muito semelhante à de DIMs, diferindo no facto de o núcleo aromático de fenoltiocerol se encontrar glicosilado. A maioria dos genes necessários à biossíntese e translocação de PGL e DIM estão localizados numa região de 70 kb entre as posições 3243697 e 3315122 bp do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, designado *locus* DIM + PGL, e incluem os genes *fadD26*, *ppsA-E*, *fadD28*, *pkc15*, *pkc1* e *fadD29*<sup>67</sup> (Fig. 1.5).

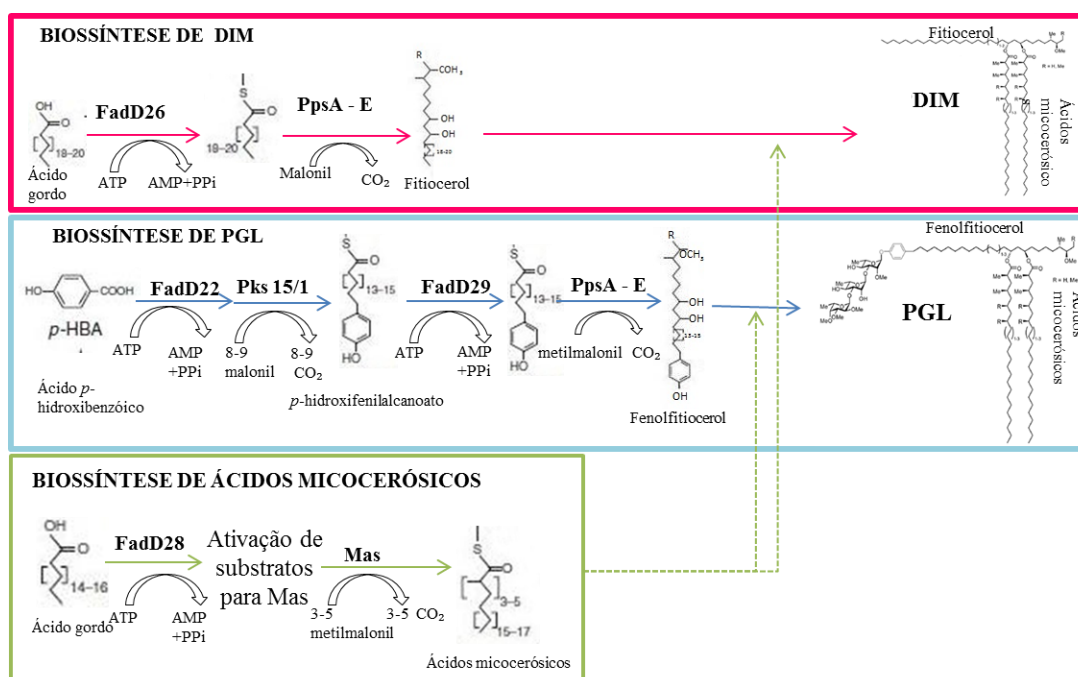


**Figura 1.5: Organização genética do *locus* DIM + PGL em *M. tuberculosis* H37Rv.** As funções dos genes estão indicadas e com códigos de cores: Cinzento - genes codificantes de proteínas envolvidas na síntese de DIM ou PG; preto - genes codificantes para proteínas envolvidas na translocação dessas moléculas; vermelho - síntese de DIM; azul - síntese de PGL; e verde - síntese de ácidos micocerosícos. Adaptado de Pérez E et al. 2004<sup>71</sup>

Os genes sintetase de poliquétidos de tipo I A, B, C, D ou E (*ppsA-E*) codificam sintetases de poliquétidos (PKS), que são responsáveis pelo alongamento de ácidos gordos ou ácidos *p*-hidroxifenilalcanóicos através da adição de unidades de malonil-Coenzima A (malonil-CoA) e metilmalonil-CoA para produção de derivados de ftiocerol e fenoltiocerol, respetivamente. A biossíntese destes dois tipos de moléculas inclui algumas enzimas comuns às duas vias, tais como PpsA-E e a proteína associada a Fas com domínio de morte 28 (FadD28), enquanto outras estão especificamente associadas à síntese de apenas uma das moléculas: no caso de PGL, destacam-se FadD22, Pks15-1 e FadD29; e na síntese de DIM, destaca-se FadD26<sup>67,68</sup>.

Os genes *fadD26*, *fadD28* e *fadD29* codificam proteínas que convertem ácidos gordos de cadeia longa em acil-adenilatos, intermediários na produção de DIM e PGL. A produção de ácidos micocerósicos, associados tanto a PGL como a DIM, deve-se a FadD28, que permite a catalização de ácidos gordos presentes no meio para substratos ativos a utilizar por uma segunda enzima membrana multifuncional (sintetase de ácidos micocerósicos - Mas), que sintetiza o último passo da reação (Fig.1.6)<sup>67,68</sup>.

FadD26 está diretamente associada à biossíntese de DIM ao modificar e catalizar o transporte da cadeia de ácidos gordos para PpsA, onde sofrerão alterações consecutivas que culminarão na produção de fitoceryl, posteriormente integrado com ácidos micocerósicos para a formação de DIM. Ferreras e colaboradores (2008) demonstraram que FadD22, ao catalizar a formação de *p*-hidroxibenzoil-AMP a partir de *p*-HBA e consequente transferência de *p*-hidroxibenzoil (*p*-HB) para o domínio transportador proteico de grupos aroil, é específico para a formação de PGL em *M. bovis* BCG<sup>67,68</sup>.



**Figura 1.6: Representação esquemática simplificada da biossíntese de DIM, PGL e ácidos micocerósicos.** O enfoque foi dado ao papel das proteínas FadD22, FadD26, FadD28, FadD29, PpsA-E, Pks15-1 e Mas na biossíntese de DIM e/ou PGL. Adaptado de Siméone R et al. 2010<sup>67</sup> e Constant P et al. 2002<sup>72</sup>.

Entre as enzimas-chave responsáveis por este processo biossintético está Pks15-1, que cataliza a elongação do ácido *p*-hidroxibenzoico a *p*-hidroxifenilcanoato e pela produção de PGL, uma vez que, caso Pks15-1 não seja produzida, não existe produção de PGL<sup>67,70,72</sup>, com consequências já evidenciadas experimentalmente ao nível da resistência das micobactérias à ação fagocitária exercida por macrófagos<sup>72</sup>.

#### 1.4.3. Importância da parede celular na interface micobactéria-hospedeiro

Os diferentes componentes da parede celular de *M. tuberculosis* apresentam importantes padrões moleculares associados a agentes patogénicos específicos (PAMPs) que, ao interagirem com os recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos maioritariamente por macrófagos e células dendríticas, desencadeiam o início da resposta imunitária contra as micobactérias<sup>65</sup>.

Os ácidos micólicos e lípidos presentes ao nível da parede celular de micobactérias como *M. tuberculosis* e *M. bovis* são alvos primários dos compostos oxidantes gerados pela resposta imunitária inata, que levam à sua degradação, eventualmente tornando a parede celular micobacteriana disfuncional<sup>73-76</sup>. No entanto, as micobactérias desenvolveram mecanismos de proteção destas moléculas e dos seus intermediários, nomeadamente através de: sobre-expressão de genes associados ao metabolismo lipídico para reparação dos danos estruturais causados<sup>48,77,78</sup>; estimulação da dissociação de ROIs e RNIs por intermédio da produção de enzimas como superóxido-dismutases e peróxido-catalases<sup>55,79,80</sup>; proteção de macromoléculas como o DNA, nomeadamente através da produção de Lsr2, uma proteína multifuncional do tipo-histona<sup>81</sup>; expressão de glicolípidos na parede celular, tais como glicolípidos fenólicos e lipoarabinomanano<sup>20,82</sup>. Acresce ainda o facto da parede das micobactérias atuar como interface com o ambiente extracelular, mediando a interação intra- e interespecies e com superfícies bióticas e abióticas.

### **1.5. Relevância da associação das micobactérias em biofilmes no contexto da infeção: hipóteses e evidências**

A tuberculose caracteriza-se pela diferenciação de subpopulações de bactérias altamente persistentes, exibindo resistência à ação exercida por antibióticos, evadindo-se e modulando o sistema imunitário do hospedeiro. Estas particularidades exibidas pelas micobactérias no contexto da infeção *in vivo* são comuns ao fenótipo de resiliência característico das comunidades microbianas organizadas em biofilmes. Um biofilme consiste numa estrutura de células microbianas irreversivelmente associadas a uma superfície biótica ou abiótica, onde as células se multiplicam e produzem uma matriz extracelular constituída por polissacáridos com propriedades adesivas que rodeiam, unem e protegem os microorganismos no seu interior. Esta matriz cria ainda uma barreira física que retém e concentra nutrientes e minerais, ao mesmo tempo que protege as células de agressões ambientais, estabelecendo-se um gradiente de oxigénio e de nutrientes e podendo limitar-se porventura, a difusão de moléculas nocivas<sup>20,83,84</sup>.

Por serem estruturas que protegem as bactérias de meios hostis e que promovem relações simbióticas<sup>83,85</sup>, a grande maioria da atividade microbiana na natureza regista-se sob a forma de biofilmes, que são igualmente relevantes do ponto de vista clínico, pela sua associação a infeções crónicas, caracterizadas por maior resistência aos antibióticos e aos compostos gerados pelo sistema imunitário, quando comparado com as células em suspensão<sup>20,86,87,88</sup>. Num biofilme maduro, os microorganismos atuam em sincronia, cooperando metabolicamente e coordenando a expressão génica pela ação de mecanismos de controlo global, sensíveis à variação da densidade celular e à acumulação de moléculas sinalizadoras que, quando presentes numa concentração crítica, vão interagir com reguladores de resposta e estimular ou reprimir a transcrição de determinantes moleculares, num processo genericamente denominado *quorum sensing*<sup>84</sup>.

Estudos recentes descrevem a formação de estruturas típicas de biofilmes durante o crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em sistema fechado, especulando-se que

estes agregados de células contribuam para o fenótipo de persistência, característico da tuberculose<sup>89,90,91</sup>. O crescimento de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em meio líquido apresenta características típicas de biofilmes, nomeadamente o crescimento em “corda”, possivelmente decorrente da elevada hidrofobicidade das células e da natureza ímpar da parede que interage com superfícies bióticas e abióticas; este fator “corda”, tem também sido associado à virulência de *M. tuberculosis*<sup>70</sup>. Por outro lado, as micobactérias formam películas na interface entre o meio de cultura e o ar<sup>70,89,91</sup>, estando já demonstrada a formação de biofilmes *in vitro* por diversas espécies de micobactérias<sup>91</sup>. Especula-se que a formação de numerosos agregados de células por *M. tuberculosis* e outras micobactérias requeiram uma expressão genética distinta da do crescimento em suspensão, não estando, no entanto, ainda identificados os determinantes moleculares associados a esse fenótipo<sup>20,64,89</sup>. Dados preliminares na literatura referem a possibilidade do envolvimento dos genes *pks1* e *pks15* de *M. tuberculosis* no processo de formação de biofilmes *in vitro*, uma vez que se verificou experimentalmente que a interrupção das respetivas sequências codificantes com recurso a transposições levava à atenuação da produção de biofilmes<sup>70</sup>.

## 2. Introdução ao tema da tese e objetivos

Estudos anteriores sugerem que *M. tuberculosis* necessita de um ambiente e programa genético específicos para formar comunidades organizadas em biofilme que abrigam células tolerantes a fármacos no interior de uma estrutura rica em ácidos micólicos livres. Contudo, os estudos experimentais focados neste aspeto da fiologia do complexo MTC são ainda muito escassos. Acresce que se desconhece a capacidade de outras espécies, nomeadamente *M. bovis*, de formarem biofilmes.

Neste trabalho, colocou-se a hipótese de que a exposição de micobactérias a limitações de oxigénio e aos stresses nitrosativo e oxidativo presentes nos granulomas poderá desencadear uma resposta de crescimento em biofilmes. Assim, os principais objetivos desta tese são: a) explorar abordagens de genómica comparativa para compreender a microdiversidade de alvos biológicos selecionados com base no seu potencial envolvimento no processo de formação de biofilmes (genes *pks1* e *pks15*) e, subjacentemente, b) caracterizar a sua funcionalidade fisiológica aparente; c) estabelecer as condições ambientais que promovem a formação de biofilmes *in vitro* por micobactérias patogénicas; d) caracterizar o efeito exercido por essas condições na fisiologia e metabolismo micobacterianos, bem como na composição de lípidos da parede celular; e e) efetuar uma análise transcricional dos genes elegidos em condições selecionadas para investigar a base molecular do crescimento em biofilme.

Definiram-se, específica e sequencialmente, as seguintes tarefas:

I: Análise da literatura e análise *in silico* de genomas de bactérias do MTC para identificação de genes potencialmente envolvidos no processo de formação de biofilmes;

II: Análise bioinformática dos polimorfismos existentes nos genes *pks1* e *pks15* de isolados do MTC, cujos genomas se encontram disponíveis nas bases de dados; modelação da estrutura tridimensional das proteínas respetivas e caracterização *in silico* das presumíveis consequências estruturais e funcionais decorrentes dos polimorfismos identificados;

III: Análise da presença de polimorfismos em *pks1* e *pks15* de isolados de *M. bovis* obtidos em Portugal por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciação de Sanger;

IV: Caracterização do crescimento em descontínuo de *M. bovis* BCG Tokyo e *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e quantificação dos biofilmes formados em meios de cultura definidos;

V: Estabelecimento de diferentes condições ambientais que potencialmente mimetizam o ambiente dentro do hospedeiro (por exemplo, stresse nitrosativo) e identificação das condições experimentais que promovem biofilmes micobacterianos;

VI: Análise e comparação relativa da resposta fisiológica de isolados de campo de *M. bovis* durante o crescimento em suspensão ou em biofilmes, quando expostos a condições de stresse estabelecidas na anterior tarefa;

VII: Análise da potencial associação entre a formação de biofilmes sob diferentes condições ambientais e a natureza e quantidade relativa dos lípidos membranares produzidos por isolados de campo de *M. bovis*, aferida preliminarmente por cromatografia em camada fina.

VIII: VI. Análise transcricional dos genes *pks1* e *pks15* por quantificação relativa da sua expressão em condições de stresse selecionadas, por recurso a RT-qPCR.

IX: Construção genética de um mutante de eliminação do gene *pks1* por recurso a uma estratégia de transdução especializada.

O trabalho descrito foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), no Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal (UEISPSA).

A presente dissertação encontra-se organizada em sete capítulos: *Introdução* (onde se faz um enquadramento do estado de arte dos temas estudados e do trabalho desenvolvido); *Introdução ao tema da tese e objetivos*; *Materiais e Métodos* (onde se descrevem as abordagens e metodologias aplicadas); *Resultados e Discussão* (onde se descrevem e se analisam sumariamente os resultados obtidos); *Considerações finais e Perspetivas futuras* (onde se discutem e enquadram os resultados do trabalho à luz do conhecimento atual), *Referências Bibliográficas* e *Anexos*.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Análise *in silico* dos polimorfismos nucleotídicos e aminoacídicos de *pks15* e *pks1* em isolados de *M. tuberculosis* e *M. bovis* e modelação da estrutura tridimensional das respetivas proteínas

A caracterização dos genes *Rv2947c* (*pks15*) e *Rv2946c* (*pks1*) foi realizada através de pesquisas bibliográficas e da consulta de bases de dados internacionais disponíveis online: *Tuberculist*<sup>92</sup>, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *InterPro*<sup>93</sup>, *TB database*<sup>94</sup>, *ExPASy*<sup>95</sup>, *Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine)*<sup>96</sup> e *STITCH (Search Tool for Interactions of Chemicals)*<sup>97</sup>. As sequências nucleotídicas e aminoacídicas de *pks1* e *pks15* de *M. tuberculosis* H37Rv (considerada a estirpe de referência neste estudo) foram obtidas da base de dados *Tuberculist* após o qual se aplicou o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (utilizando o algoritmo *Megablast* para sequências nucleotídicas ou *BLASTp* para sequências aminoacídicas, dirigido ao género *Mycobacterium* na base de dados do NCBI<sup>10</sup>.

Foram considerados apenas os genomas completos. As sequências obtidas no formato *Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm* (FASTA) foram curadas manualmente e alinhadas com o programa ClustalX 2.1, anotando-se as variações nucleotídicas (eliminações, inserções ou SNPs) e substituições aminoacídicas (conservativas, semi-conservativas e não conservativas). As informações relativas aos isolados analisados estão disponíveis em anexo na Tabela A7.1. A identificação dos domínios funcionais foi realizada com a ferramenta *Conserved Domain Database* (CDD) disponibilizada pelo NCBI. Com base nas sequências aminoacídicas, inferiu-se o modelo da estrutura tridimensional das duas proteínas para alguns dos isolados analisados considerando a magnitude de alterações face à referência considerada. Considerando a variação nucleotídica ao nível de *pks15* e *pks1*, inferiu-se a história microevolutiva destes genes com base na análise dos genomas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* realizada no presente estudo. O cladograma foi obtido no ClustalX após alinhamento, e editados no FigTree<sup>98</sup> (disposição polar, perfis alinhados com raiz centrada).

### 3.2. Caracterização e manutenção de culturas e condições de crescimento de pré-inóculos e inóculos em meio sólido e líquido

As estirpes e isolados usados na presente dissertação (descritos na Tabela A7.2 (Anexo)) foram congeladas a -80 °C em 800 µl de glicerol (86% v/v) com 100 µl de Middlebrook 7H9 (BDDifco<sup>TM</sup>) para *Mycobacterium* spp., ou 100 µl de LB (*Luria-Bertani*) para *E. coli*. A descrição dos meios de cultura usados nos diferentes ensaios encontra-se na Tabela A7.3 (Anexo). Utilizaram-se 15 µl das culturas para inoculação: estirpes de *M. bovis* foram inoculadas em Stonebrink<sup>TM</sup> (*Biogerm*), Lowenstein Jensen piruvato (*Biogerm*) ou Middlebrook 7H10 (BDDifco<sup>TM</sup>) suplementado com 10% ADS (albumina sérica bovina 50 g/l, dextrose 20 g/l, cloreto de sódio 8,5 g/l) 0,5% piruvato de sódio e 0,05% Tween®80 (designado por 7H10 piruvato), envolvendo-se as placas de petri em parafilme para evitar desidratação. *M. smegmatis* foi inoculado em Middlebrook 7H10 + 10% ADS, 0,5% glicerol e 0,05% Tween®80 (designado por 7H10 glicerol). O crescimento de *E. coli* realizou-se em placas de Petri com LB. Culturas de *E. coli*/ pYUB854 e *E. coli*/ phAE159 foram suplementadas respetivamente com higromicina 50 mg/ml (*Invitrogen*) e ampicilina 100 mg/ml (*Nzytech*). Todas as culturas foram incubadas em aerofilia a 37 °C, por diferentes períodos (quatro dias para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, um a dois meses (ou até surgirem colónias) para *M. bovis*; um a três dias (ou até surgirem colónias) para *E. coli*). Colónias isoladas foram repicadas para novas placas e incubadas como acima descrito, dois dias para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, sete dias para *M. bovis* BCG Tokyo, quatro a seis dias para *M. bovis* e um dia para *E. coli*. Os pré-inóculos foram preparados repicando colónias isoladas para tubos cónicos (50 ml, *Sarstedt*) incubados com agitação a 37 °C entre 24 h e três semanas, dependendo da estirpe (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1: Pré-inóculos usados, respetivos meios de crescimento e períodos de incubação.** Legenda: h: horas, sem: semanas

Estirpes	Meio de cultura líquido	Incubação
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Middlebrook 7H9 + 2 ml de glicerol + 10% (v/v) ADS	24 h-48 h
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo	Middlebrook 7H9 + 0,5% piruvato de sódio + 10% (v/v) ADS	2-3 sem
<i>M. bovis</i> I, II, III, IV	Middlebrook 7H9 + 0,5% piruvato de sódio + 10% (v/v) ADS	2-3 sem
<i>E. coli</i> HB101	LB	24 h
<i>E. coli</i> / pYUB854	LB + higromicina 50 mg/ml	24 h-48 h
<i>E. coli</i> / phAE159	LB + higromicina 50 mg/ml	24 h-48 h
<i>E. coli</i> / phAE 159	LB + ampicilina 100 mg/ml	24 h-48 h

### 3.3. Análise de polimorfismos da região intergênica *pks15/pks1* em isolados de campo de *M. bovis* por PCR e sequenciação

Para caracterizar a região intergênica *pks15/pks1* de 24 isolados de campo de *M. bovis* obtidos em Portugal (incluindo quatro, *M. bovis* I, II, III e IV, com spoligotipo idêntico, que foram selecionados para ensaios de crescimento em descontínuo) por PCR, utilizaram-se sequências oligonucleotídicas iniciadoras (*primers*) descritas por Constant e colaboradores (2002)<sup>72</sup>. A descrição das condições reacionais, de amplificação, e características da região amplificada encontra-se na Tabela A7.4 (Anexo) e A7.5 (Anexo), respetivamente. O produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose (*Nzytech*) a 1,5% (m/v), utilizando o marcador de massas moleculares HyperLadder™ IV (*Bioline*). Os fragmentos de dimensão correspondente à região pretendida foram purificados por sistema comercial (*QIAQuick*, *Quiagen*). As amostras foram diluídas em água livre de nucleases e sequenciadas pelo método de Sanger (*GATC Biotech*), tendo sido analisados os eletroferogramas (*Genedoc 2.7*) e alinhamento das sequências nucleotídicas (*ClustalX 2.1*) para inferência de variações nucleotídicas.

### 3.4. Efeito de stresses ambientais na formação de biofilmes e sobrevivência celular

Para avaliar a resposta fisiológica de micobactérias a diferentes condições ambientais quanto ao seu crescimento em suspensão ou em biofilmes, selecionaram-se condições de stresse com base em resultados de *microarrays* (TB Database) que indicavam sobre-expressão ou sub-expressão dos genes *pks15* e *pks1*. Suplementou-se 7H9 com fonte de carbono adequada e com diferentes concentrações dos compostos testados: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 e 9 mM) (*GSL*), NaNO<sub>2</sub> (5, 10 e 25 mM) (*Merck*), metil de viologénio (MV) (25, 50, 100 e 150 µM) (*Sigma-Aldrich*), ácido ascórbico (10 e 15 mM) (*VWR*), colesterol (1 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*), e Tween®80 1% (*Sigma-Aldrich*). As culturas foram inoculadas com absorvância a 600 nm (*Abs*<sub>600 nm</sub>) de 0,05 em microplacas de 12 poços (*Corning*) contendo 2 ml de meio de cultura e incubadas a 37 °C por sete dias ou três semanas, para *M. smegmatis* e *M. bovis* respetivamente, e envoltas em parafilme. Após incubação, foram usados 100 µl da suspensão celular para realizar diluições seriadas de base 10 em 7H9 glicerol (*M. smegmatis*) ou 7H9 piruvato (*M. bovis*), e inoculou-se em placas de 7H10 glicerol (*M. smegmatis*) ou 7H10 piruvato (*M. bovis*). As placas foram incubadas a 37 °C, envoltas em parafilme, até ser possível a contagem de colónias à lupa para calcular UFCs: dois a três dias (*M. smegmatis*), uma semana (*M. bovis* BCG Tokyo) ou três a quatro dias (isolados de campo de *M. bovis*).

A taxa de sobrevivência foi estimada comparando as UFCs obtidas após crescimento, entre a condição controlo (7H9 sem stresse) e a condição testada. Para avaliar o biofilme formado, removeu-se a suspensão celular dos poços, lavou-se três vezes com água destilada estéril, adicionou-se 2 ml de violeta de cristal 1% (*Merck*) por 15 min, lavando-se de seguida três vezes com água destilada estéril. O biofilme corado foi ressuscitado em 2 ml de etanol 95%, aguardou-se 15 min e registou-se a absorvância (*Abs*<sub>590 nm</sub>), estimando-se a diferença entre as absorvâncias face ao controlo negativo (não inoculado). Para *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo, realizou-se um mínimo de três experiências independentes, enquanto para isolados de campo de *M. bovis* realizaram-se duas experiências independentes. Os inóculos



iniciais foram determinados em cada ensaio por plaqueamento de diluições seriadas em 7H10, com ordens de grandeza compreendidas entre  $10^7$  e  $10^8$  UFCs.

### 3.5. Análise do crescimento celular perante diferentes condições ambientais

Após aferir algumas das condições de crescimento em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo (resultados não mostrados), selecionou-se um subconjunto de condições para testar a resposta fisiológica de *M. bovis* II. O crescimento iniciou-se em 100 ml de 7H9 piruvato com Abs<sub>600 nm</sub> inicial de 0,1 em frascos de cultura celular de 600 ml (*Corning*) e adição imediata dos suplementos em teste, incubadas a 37 °C até à contagem do número de colónias à lupa (duas experiências independentes). Efetuaram-se diluições seriadas de base 10 em 7H9 piruvato para determinar viabilidades celulares, inoculadas e incubadas como descrito anteriormente. A descrição dos diferentes estudos realizados para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. bovis* BCG Tokyo e *M. bovis* II encontra indicada na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2: Condições e características dos crescimentos em descontinuo para *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo.** Legenda: d: dia(s), sem: semana(s)

Estirpe	Fonte de carbono	Tempo entre medições de Abs <sub>600nm</sub>	Condições em estudo	Incubação	Incubação (placas)
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Glicerol	3h em 3h	<ul style="list-style-type: none"> <li>7H9 suplementado com Tween®80 0,05% c/ agitação (120 rpm)</li> <li>7H9 suplementado com Tween®80 0,05% sem agitação</li> </ul>	1sem	3d
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo	Piruvato	1º ponto às 60h; restantes de 12h em 12h	<ul style="list-style-type: none"> <li>7H9 suplementado sem Tween®80 com agitação</li> <li>7H9 suplementado sem Tween®80 com agitação.</li> </ul>	2 sem	1sem
<i>M. bovis</i> II	Piruvato	1º ponto às 24h; restantes de 48h em 48h	Suplementação de 7H9 com: <ul style="list-style-type: none"> <li>25 mM NaNO<sub>2</sub></li> <li>9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>150 µM metil de viologénio</li> <li>15 mM ácido ascórbico</li> <li>1 mg/ml de colesterol</li> <li>15 mM ácido ascórbico + 150 µM metil de viologénio</li> <li>15 mM ácido ascórbico + 25 mM NaNO<sub>2</sub></li> </ul>	2sem, s/agitação	4d

### 3.6. Análise estatística dos resultados

Para comparar o biofilme formado e a taxa de sobrevivência em relação à condição controlo, foi aplicado um *repeated measures* ANOVA (teste de Friedman  $\alpha=0,05$ ) seguido do pós-teste *Dunn's multiple comparison* (*GraphPad Prism 5.00*), com três níveis de significância: \* significativo ( $\alpha<0,05$ ), \*\* muito significativo ( $\alpha<0,01$ ) e \*\*\* extremamente significativo ( $\alpha<0,001$ ). Os resultados estão apresentados como médias aritméticas e desvio padrão calculados com base nas várias experiências independentes.

Para o crescimento celular sob diferentes stresses, os valores de absorvância e de UFCs foram representados graficamente em função do tempo (*GraphPad Prism 5.00*). A taxa de crescimento específica máxima ( $\mu_{max}$ ) foi calculada [ $\mu = \frac{\ln DO_2 - \ln DO_1}{t_2 - t_1}$ ], tendo sido considerados os valores de Abs<sub>600 nm</sub> durante a fase exponencial de crescimento. Os resultados estão dispostos como médias e desvio padrão de duas experiências independentes.

### 3.7. Perfil lipídico de *M. bovis* II em diferentes condições ambientais

#### 3.7.1. Extração e purificação de lípidos celulares

As culturas *M. bovis* II foram crescidas em 100 ml 7H9 piruvato com os diferentes stresses (descritos na tabela 3.2) até à fase estacionária de crescimento (15 dias para *M. bovis*), com Abs<sub>600 nm</sub> inicial 0,1 em ambiente BSL-3 a 37 °C. A suspensão celular foi separada do sobrenadante por centrifugação (3000 rpm, 10 min) (*Spectrafuge™ 16M*). Ao sedimento,

adicionou-se clorofórmio (*Sigma-Aldrich*) e metanol (*Sigma-Aldrich*) numa proporção 2:1 (v/v), transferindo-se para frascos cónicos de 50 ml e agitando-se (*IKA Schuttler™*) por dois dias, 37 °C, período após o qual as amostras foram retiradas do BSL-3 e se adicionou clorofórmio e metanol (1:1) e centrifugou-se a 3000 rpm, 10 min, 4 °C (*KUBOTA KR-2000C*), removendo-se a fase aquosa (superior). Lavou-se a fase orgânica duas vezes com água estéril e centrifugou-se a 3000 rpm, 5 min, 4 °C (fase aquosa sempre descartada). A fase orgânica foi seca à temperatura ambiente dentro da *hotte* e os extratos lipídicos ressuspensos em clorofórmio. Os extratos foram guardados a 4 °C, selados e protegidos da luz.

### **3.7.2. Análise por cromatografia em camada fina (TLC)**

A técnica de TLC foi realizada em placas de sílica gel com indicador de fluorescência 60 F<sub>254</sub> (20x20 cm *Merck*) ativadas a 100 °C por uma hora. A zona de aplicação das amostras (40 µl) foi marcada a 2 cm do início da placa. Foi utilizado como mistura de solventes CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 95:5 (v/v). A câmara foi selada com silicone e a corrida parada quando a frente de corrida se encontrava a aproximadamente 2 cm do final da placa. A revelação da placa fez-se por recurso a luz ultravioleta com comprimento de onda de 302 (*UVP, M-20*), 254 e 366 nm e luz branca (*DESAGA, M-20*).

## **3.8. Análise transcricional dos genes *pks15* e *pks1* para a estirpe *M. bovis* II**

### **3.8.1. Extração de RNA**

A cultura foi inoculada em 10 ml 7H9 piruvato (em âmbito BSL-3), em frascos de poliestireno de 50 ml (*Nunclon™*) a 37 °C. Após atingir Abs<sub>600 nm</sub> 0,3, impuseram-se os stresses selecionados: 9 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25 mM NaNO<sub>2</sub>, 150 µM MV, 15 mM ácido ascórbico ou 1 mg/ml colesterol, e incubou-se por 48 h. Após esse período, centrifugou-se a cultura (12000 rpm, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi removido e ressuspendeu-se o sedimento formado em 750 µl de TRIzol® (*Life Technologies*). Fora do BSL-3, realizou-se lise mecânica com microesferas (*TeSeE™ -Bio Rad*) no equipamento *FastPrep FP120 Bio101* por 45 s a 6,5 velocidades (*Savant Instruments*), duas vezes. O restante processo foi seguido de acordo com o protocolo descrito para TRIzol® (*Invitrogen*). Trataram-se as amostras com DNAaseI (*NewEnglandBiolabs*) (1 h, 37 °C), adicionando-se EDTA 5 mM (10 min, 75 °C) para inativação da enzima. Realizou-se a medição da concentração de RNA com recurso ao equipamento *Nanodrop™* e por fluorimetria por *Qubit™* (*Life Technologies*), e estimou-se o volume necessário para reações com 20 ng de RNA.

### **3.8.2. Quantificação relativa da expressão dos genes *pks15* e *pks1* por RT-qPCR**

Para avaliar a expressão dos genes alvo, normalizada face à expressão do gene de referência *16S rDNA*, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR) via transcriptase reversa (RT). Os *primers* específicos para amplificação do cDNA dos genes alvo foram desenhados para a extremidade 3' (*Primer3 v.0.4.0*). As informações da região alvo, condições reacionais e de amplificação encontram-se nas Tabelas A7.4 e A7.5 (em anexo). O protocolo foi otimizado ao nível da temperatura de hibridação dos *primers* e concentração de magnésio em reações de PCR convencional. Utilizou-se como controlo positivo DNA total de *M. tuberculosis* H37Rv, em termociclador *MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler* (*Biorad*). O produto

foi corrido em eletroforese (80 V, 1 h) num gel de agarose (Nzytech) a 3%, utilizando o marcador de massas moleculares Nzytech V (Nzytech). Verificando-se os fragmentos de tamanho esperado, repetiu-se o processo em sistema de PCR em tempo real. O produto do qPCR foi corrido em eletroforese (Labnet) e gel de agarose (Nzytech) a 3%, utilizando o marcador de massas moleculares Nzytech V (Nzytech). Após a otimização das condições, realizou-se a transcrição reversa e PCR em tempo real num só passo (RT-qPCR) com o sistema comercial *iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit* (Biorad) em termociclador *C1000™ Thermal Cycler* (Biorad).

### 3.8.2.1. Análise estatística dos resultados

A análise da expressão relativa implicou a normalização dos níveis de expressão dos genes em estudo em relação à expressão do gene *rDNA 16S* em cada condição estudada e comparação com uma amostra calibradora (condição controlo). Foram efetuadas réplicas biológicas dos ensaios de crescimento e as reações de amplificação padronizadas, realizadas em duplicados ou triplicados, considerando-se uma eficiência de amplificação semelhante, o que permitiu a aplicação do método de  $\Delta\Delta Ct$  para cálculo dos níveis de expressão (calculado por aplicação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). O ciclo limite ( $Ct$ ) pode ser determinado pela interseção da linha do limiar de deteção da reação (*threshold*), com a linha de amplificação de cada amostra. O valor de  $\Delta\Delta Ct$  foi calculado da seguinte forma:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_2$  ( $Ct$  gene condição testada –  $Ct$  gene *rRNA 16S* condição testada) –  $\Delta Ct_1$  ( $Ct$  gene condição calibradora –  $Ct$  gene *rRNA 16S* condição calibradora).

### 3.9. Construção de um mutante de eliminação do gene *pks1* por transdução especializada

A construção de um mutante de eliminação do gene *pks1* por transdução especializada (Fig 3.7) teve como objetivo inferir o papel fisiológico do gene alvo, baseando-se numa mutagénesis dirigida, permitindo a disrupção de *pks1* por recombinação homóloga e a obtenção de um mutante isogénico sem efeitos polares. O trabalho teve várias fases: desenho de *primers* para construção do substrato de troca alélica (AES) que corresponde ao gene *pks1* interrompido por uma cassette de higromicina, clonando as extremidades do gene *pks1* a montante e jusante da cassette no cosmídeo pYUB854; a ligação do cosmídeo ao fagemídeo phAE159 e empacotamento *in vitro*; a transdução em estirpes selecionadas e disrupção de *pks1* por recombinação homóloga; e a remoção da cassette de marcador seletivo por ação de resolvases codificadas por um plasmídeo.

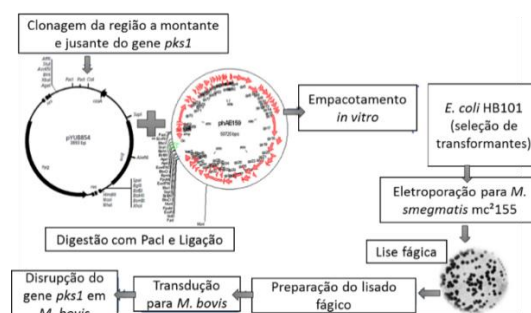


Fig. 3.7: Esquema ilustrativo do protocolo de transdução especializada para construção do mutante de eliminação de *pks1*. Adaptado de Bardarov *et al.*, 2002<sup>99</sup>

As informações relativas às regiões amplificadas do gene *pk<sub>s</sub>1*, condições reacionais e de amplificação (*MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Biorad)*), e dos plasmídeos utilizados encontram-se nas Tabelas A7.5 e A7.4 (Anexo) e Tabela 3.3., respetivamente.

**Tabela 3.3.: Características e informações disponíveis sobre os plasmídeos utilizados na presente dissertação.**

Plasmídeo	Características	Referência/Fonte
pYUB854	Contem uma origem de replicação para <i>Escherichia coli</i> ( <i>oriE</i> ), locais <i>cos</i> , locais <i>resolvase</i> e locais de corte <i>PacI</i> . Contém cassette de resistência de higromicina.	Bardarov <i>et al.</i> , 2002 <sup>99</sup>
phAE159	Fagemídeo derivado do phAE87. Contém uma eliminação de 5,6 kb que permite receber grandes insertos de DNA. Marca de resistência de ampicilina.	Bardarov, <i>et al.</i> , 2002 <sup>99</sup>
<i>pk<sub>s</sub>1</i> /pYUB854	Extremidades do <i>pk<sub>s</sub>1</i> clonado no vetor pYUB854.	Este trabalho
<i>pk<sub>s</sub>1</i> /pYUB854/ phAE159	Cosmídeo pYUB854/ <i>pk<sub>s</sub>1</i> ligado ao fagemídeo phAE159.	Este trabalho

### 3.9.1. Construção do cosmídeo pYUB854-*pk<sub>s</sub>1*

Desenharam-se *primers* específicos para amplificação das regiões a montante (5') e jusante (3') de *pk<sub>s</sub>1* (Primer3 v.0.4.0) inserindo-se também as sequências de reconhecimento das enzimas usadas para clonar os fragmentos no vector a montante e a jusante da cassette de higromicina. Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose a 0,8% (m/v), (90 V, 1 h 30 min) utilizando-se como marcador de massas moleculares Nzytech VI (*Nzytech*).

A extremidade 5' do gene e o vetor pYUB854 foram digeridos com *SpeI* e *HindIII* (1h 37 °C) com posterior eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) (90 V, 1 h 30 min), do qual foram extraídas e purificadas os respetivos fragmentos (Gel Band Purification, *GE Healthcare*). Realizou-se a ligação entre o cosmídeo e o fragmento amplificado com a enzima T4 DNA ligase (*NEB*) durante 30 min à temperatura ambiente e transformou-se *E. coli* (*NZYStar Competent Cells*, (*Nzytech*) seguindo o protocolo do fornecedor, plaqueando-se em meio LB sólido (higromicina 50 mg/ml) com incubação a 37 °C. As colónias isoladas foram crescidas em LB líquido com antibiótico para extração de DNA plasmídico (*NZYMiniprep™*), digestão com *SpeI/HindIII*, seguida de eletroforese (90 V, 1 h 30 min) em gel de agarose a 1% (m/v), para confirmação da clonagem do fragmento. Após a confirmação da existência de transformantes contendo a extremidade 5' clonada, repetiu-se o protocolo supra descrito para clonagem da extremidade 3' de *pk<sub>s</sub>1* nos locais *KpnI/XbaI*.

### 3.9.2. Ligação entre *pk<sub>s</sub>1*/pYUB854 e fagemídeo phAE159, transfeção para *E. coli* HB101 e eletrotransformação em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155

Culturas de *E. coli* que albergavam *pk<sub>s</sub>1*/pYUB854 e o fagemídeo phAE159 foram crescidas em LB 50 mg/ml de higromicina ou LB suplementado 100 mg/ml de ampicilina, respetivamente. O DNA cosmídico e fagemídico foi extraído, respectivamente com *NZYMiniprep™* e QIAEX® II Gel Extraction (*Qiagen*), seguindo-se a digestão enzimática de ambas as amostras com 1 µl de *PacI* (*NEB*), 2,5 µl de tampão da enzima CutSmart (*NEB*) e 0,5 µl de BSA por 2 h a 37 °C, e posterior inativação (10 min, 65 °C) em termobloco (*Labnet*). O cosmídeo e fagemídeo foram ligados com a enzima T4 DNA ligase (*NEB*) para um volume final de 20 µl, com 1 µl da enzima T4 DNA ligase (*NEB*) e 2 µl do tampão 10x (*NEB*), por 2 h a 37 °C. Seguiu-se a encapsidação *in vitro* com o sistema comercial Gigapack III XL (*Agilent*) e amplificação em *E. coli*. O protocolo foi realizado como descrito por Bardarov e colaboradores<sup>99</sup>. Após eletroporação de células competentes de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, as placas foram incubadas à temperatura permissiva de 30 °C por uma semana. O aparecimento

de placas fágicas confirmaria o sucesso da eletroporação<sup>99</sup>. O restante procedimento não se encontra descrito, uma vez que não foram obtidos os eletrotransformantes pretendidos.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Análise *in silico* de sequências nucleotídicas e aminoácídicas de *pks15* e *pks1*

#### 4.1.1. Os genes *pks15* e *pks1* - Descrição e principais funções

Os genes *pks15* (Rv2947c) e *pks1* (Rv2946c) estão localizados na cadeia complementar do genoma de *M. tuberculosis*, situando-se entre as posições 3296350 e 3296353 pares de bases (pb) do genoma da estirpe H37Rv. Já no genoma de *M. bovis*, *pks15* e *pks1* recebem a denominação conjunta *Mb2971c*, situando-se na cadeia complementar, entre as posições 3248190 e 3254528 pb. Têm, respetivamente, 1491 e 4851 pb, codificando a sintetase de poliquétidos Pks15-1, na qual as subunidades correspondentes aos produtos dos genes *pks15* e *pks1* podem estar associadas a duas ORFs ou apenas a uma, dependendo da estirpe. A análise bioinformática por pesquisa de homologia sugere a presença de seis domínios funcionais presentes em Pks15-1, nomeadamente: cetoacilsintetase (KS), formado a partir do transcrito do gene *pks15*; aciltransferase (AT), desidratase (DH), enoilredutase (ER), cetoreductase (KR) e proteína transportadora de grupos acilo (ACP), formados a partir do transcrito do gene *pks1*. Juntos permitem a alongação do ácido *p*-hidroxibenzóico a *p*-hidroxifenilcanoatos, um passo crucial na via de biossíntese de PGL<sup>67,70</sup>. A localização generalizada dos genes *pks15* e *pks1*, posição e dimensões relativas dos seus domínios e genes imediatamente a montante e jusante estão representados na Fig.4.8.

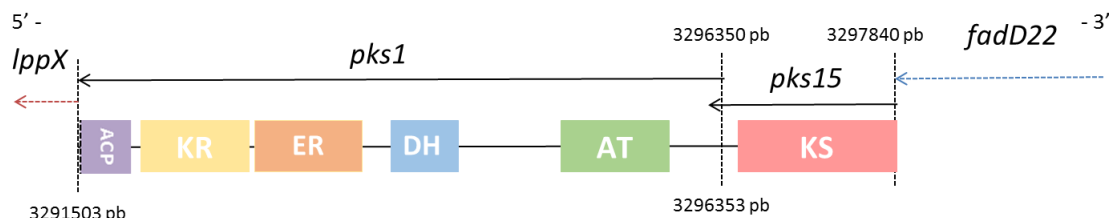


Figura 4.8: Representação esquemática da localização dos genes *pks1* e *pks15* na cadeia complementar do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv e tamanho relativo dos domínios funcionais, de acordo com resultados de pesquisa de homologia. O gene a montante de *pks15*, *fadD22* está associado ao metabolismo lipídico, enquanto o gene a jusante de *pks1*, *lppX*, está associado à produção de lipoproteínas da parede celular. Adaptado de Mitchell A. et al. 2015<sup>93</sup>.

#### 4.1.2. Identificação de polimorfismos nas sequências nucleotídicas dos genes *pks15* e *pks1* em *M. bovis* e *M. tuberculosis*

A análise das sequências nucleotídicas dos genes *pks15* e *pks1* presentes nos genomas de 67 isolados (46 de *M. tuberculosis* e 21 de *M. bovis*), foi efetuada por comparação com a sequência correspondente da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv, tendo sido consideradas polimórficos todos os isolados que apresentavam pelo menos uma alteração face à estirpe de referência. Dos 46 isolados de *M. tuberculosis* analisados, 25 não apresentavam qualquer polimorfismo face a *M. tuberculosis* H37Rv. A frequência dos polimorfismos registados encontra-se sumariada por domínio na Figura 4.9. e na Tabela 4.4. As anotações de inserções, eliminações e SNPs foram realizadas considerando a primeira base da sequência codificante para a primeira ORF, correspondente ao início de *pks15*.

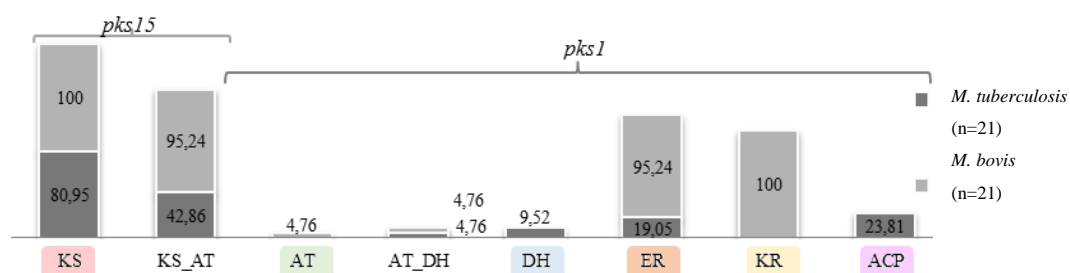


Figura 4.9: Frequência relativa (em porcentagem) de estirpes com alterações nucleotídicas nos genes *pks15* e *pks1*, e respectivos domínios, usando como referência o genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Os domínios encontram-se representados por colunas, assim como as regiões intermédias entre domínios (KS\_AT, AT\_DH), sempre que nelas se registou pelo menos um polimorfismo face a *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabela 4.4: Total e tipo de alterações registadas nas sequências nucleotídicas dos genes *pks15* e *pks1*, por domínio, para as estirpes *M. bovis* e *M. tuberculosis* que apresentavam pelo menos uma alteração face à estirpe de referência.

Domínios	Eliminação	Inserção	SNP	Total alterações (%)	Número de estirpes c/ alteração (%)
KS	0	0	3	3 (9,09)	38 (90,48)
KS_AT	0	2	0	2 (6,06)	29 (69,05)
AT	0	0	1	1 (3,03)	1 (2,38)
AT_DH	0	0	2	2 (6,06)	2 (4,76)
DH	1	0	1	1 (3,03)	1 (2,38)
ER	1	1	3	5 (15,15)	24 (57,14)
KR	1	0	4	5 (15,15)	21 (50,00)
ACP	3	2	8	13 (39,39)	5 (11,90)
Total (%)	6 (18,18)	5 (15,15)	22 (66,67)	33 (100)	

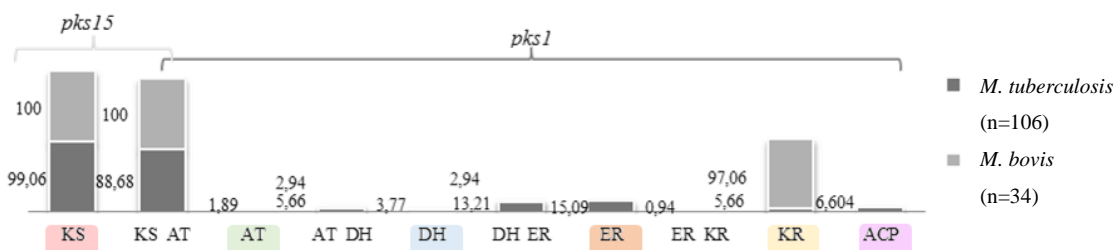
Cerca de 67% de todas as alterações registadas nos domínios em análise são SNPs, sendo a maioria registada nos domínios KR e ACP. A análise destas sequências permitiu ainda verificar que, apesar do domínio ACP acumular maior percentagem de polimorfismos (39,39% de todas as alterações registadas em todos os domínios), não representa os polimorfismos mais comuns na população (associados a apenas 11,90% das estirpes de *M. tuberculosis* estudadas, e sem qualquer polimorfismo registado em *M. bovis*). Já no domínio KS e na região intermédia entre o domínio KS e AT (KS\_AT), apesar de se registar uma percentagem reduzida de polimorfismos (9,09%), estes são muito mais comuns na população analisada (90,48%). De uma forma geral, *M. bovis* apresenta poucos polimorfismos nestas duas ORFs, ao contrário de *M. tuberculosis*, cujas sequências são muito variáveis. Contudo, existem estirpes de *M. bovis* que apresentam polimorfismos únicos, como o caso de *M. bovis* 082211, *M. bovis* 0808BF2 e *M. bovis* AN5\_ctg0052. Estes polimorfismos nas sequências nucleotídicas podem originar uma proteína com estrutura tridimensional e função distintas, como o caso de *M. tuberculosis* 0B169XDR, que apresenta uma eliminação muito precoce na sequência do gene *pks1*, ou *M. bovis* 0808BF2, com uma eliminação no domínio KR que se prolonga até à extremidade 3' do gene *pks1*. A ausência de locais de ligação para grupos acilo é comum a *M. tuberculosis* 0B228DS e *M. tuberculosis* 0B026XDR. Os resultados obtidos sugerem ainda que a região intergénica entre os genes *pks15* e *pks1* apresenta uma variabilidade considerável nos genomas analisados (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5: Representação dos polimorfismos identificados nos loci *pks15-1* em *M. tuberculosis* e *M. bovis*.** A presença dos polimorfismos encontra-se representada a sombreado. As sequências foram comparadas com a sequência correspondente da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv (estirpe de referência).

Estirpe representante do perfil identificado (Nº de estirpes com perfil idêntico)	<i>pks15</i>			Região entre <i>pks15</i> e <i>pks1</i>	
	KS (141 a 1401 pb)			Região intergênica <i>pks15-1</i> (1402 a 1745 pb)	
	c.287 C>G	c.998 T>C	c.1120 G>C	c.1461 a c.1468 Ins. GGGCCGC	c.1461 Ins. G
<i>M. tuberculosis</i> 49-02 (n=7)					
<i>M. tuberculosis</i> 7199-99 (n=4)					
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv3 (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> RGTB327 (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> Beijing-NITR203 (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> UT205 (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> 96075 (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> 0B229DS (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> EAI5-NITR206 (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> 0B228DS (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> 0B026XDR (n=1)					
<i>M. tuberculosis</i> 0B169XDR (n=1)					
<i>M. bovis</i> 0808BF2_ctg0001 (n=1)					
<i>M. bovis</i> 082211_ctg0056 (n=1)					
<i>M. bovis</i> AN5_ctg0052 (n=1)					
<i>M. bovis</i> AF2122/97 (n=18)					

#### 4.1.2.2. Análise dos polimorfismos registrados nas sequências aminoacídicas deduzidas dos genes *pks15* e *pks1* de *M. bovis* e *M. tuberculosis*

A análise das sequências nucleotídicas evidenciou a possibilidade das alterações detetadas terem consequências profundas ao nível aminoacídico. Deduziu-se a sequência aminoacídica a partir das sequências nucleotídicas analisadas usando a ferramenta *Translate tool* (ExPASy), às quais se associaram outras 100 sequências aminoacídicas disponíveis no NCBI, analisando-se um total de 142 sequências (106 de *M. tuberculosis* e 34 de *M. bovis*), listadas na Tabela A7.1 (em anexo). Anotaram-se os polimorfismos em relação à sequência deduzida da estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 4.10 e Tabela 4.6).



**Figura 4.10: Frequência relativa (em percentagem) de estirpes com polimorfismos aminoacídicos em Pks15 e Pks1 calculada e representada pelos respectivos domínios.**

**Tabela 4.6: Total de alterações registadas nas sequências aminoacídicas deduzidas de *pks15* e *pks1* ou presentes na base de dados NCBI, analisadas por domínio, para as estirpes *M. bovis* e *M. tuberculosis*.** As alterações nos isolados estudados (N) foram caracterizadas como eliminações (DEL), inserções (IN) ou polimorfismos de nucleótido único (SNP). A região entre os domínios KR e ACP não apresentou polimorfismos. C: mutação conservativa, SC.: mutação semi-conservativa, NC: mutação não conservativa.

Domínios	Eliminações		Inserções		SNP			Total alt. por Domínio (%)
	DEL	N(%)	IN	N (%)	SNP	Nº e tipo de SNP	N (%)	
KS	2	3 (2,1)	1	1 (0,7)	19	C (n=2) SC (n=4) NC (n=13)	2 (1,4) 141 (99,3) 58 (40,8)	22 (10,3)
KS_AT	0	0	1	96 (67,6)	9	SC (n=1) NC (n=8)	1 (0,7) 130 (91,5)	10 (4,7)
AT	0	0	0	0	1	C (n=1)	1 (0,7)	1 (0,5)
AT_DH	0	0	0	0	8	C (n=2) SC (n=3) NC (n=3)	2 (1,4) 3 (2,1) 4 (2,8)	8 (3,7)
DH	0	0	0	0	3	C (n=1) NC (n=2)	1 (0,7) 3 (2,1)	3 (1,4)
DH_ER	0	0	0	0	7	C (n=2) SC (n=1) N C. (n=4)	17 (12) 1 (0,7) 1 (0,7)	7 (3,3))

ER	6	13 (9,2)	0	0	63	C (n=15)	18 (12,7)	69 (32,2)
						SC (n=9)	1 (0,7)	
						NC (n=39)	4 2,8()	
ER_KR	1	1 (0,7)	0	0	0	0	0	1 (0,5)
KR	12	5 (3,5)	0	0	58	C (n=9)	3 (2,1)	70 (32,7)
						SC (n=19)	33 (23,2)	
						NC (n=30)	34 (24)	
ACP	2	5 (3,5)	0	0	21	C (n=2)	6 (4,2)	23 (10,8)
						SC (n=7)	5 (3,5)	
						NC (n=12)	6 (4,2)	
Total alt. (%)	23 (10,75)		2 (0,93)		189 (88,32)			214 (100)

No total, registaram-se 214 alterações nas sequências aminoacídicas analisadas, por comparação com a sequência correspondente em *M. tuberculosis* H37Rv. Os domínios ER e KR aparentam ser os menos conservados de entre os domínios analisados, concentrando cerca de 65% de todos os polimorfismos detetados. Por outro lado, a região compreendida entre os domínios ER e KR, KR e ACP e o domínio AT são altamente conservados.

Cerca de 88% de todas as alterações registadas nos domínios em análise são SNPs, sendo também mais frequentes nos domínios ER e KR. Contudo, à semelhança do registado na análise das sequências nucleotídicas, as regiões onde mais isolados continham polimorfismos foram o domínio KS e a região entre os domínios KS e DH, que coincide com as regiões 3' do gene *pks15* e 5' do gene *pks1*. Ainda de acordo com a análise das sequências nucleotídicas, as estirpes de *M. bovis* apresentam sequências aminoacídicas muito mais conservadas, no entanto o número de estirpes analisadas também foi menor. Todas as estirpes que, como *M. tuberculosis* H37Rv, apresentam um codão *STOP* na zona intergénica dos genes *pks15* e *pks1*, originam um transcrito apenas com a região correspondente ao domínio KS, não estando estabelecida a função para o gene *pks15* sozinho.

Cerca de 69% das estirpes de *M. tuberculosis* analisadas apresentam polimorfismos que impedem a produção do transcrito completo do gene *pks1* pela presença de mutações que levam à alteração da grelha de leitura com a produção de um codão *STOP* prematuro. Uma das estirpes que apresenta maior variação é *M. tuberculosis* 0B229DS, com 134 polimorfismos, situando-se 93% destes a partir do domínio ER e prolongando-se até ao domínio ACP, onde um codão *STOP* prematuro leva à produção de uma proteína truncada, distinta das sintetizadas por *M. bovis* ou *M. tuberculosis* H37Rv. Consistente com esta evidência, a pesquisa dos domínios conservados na sequência através da ferramenta CDD do NCBI demonstra uma ausência dos domínios ER, RK e ACP.

#### 4.1.2.3. Análise da região intergénica *pks15-pks1* (3296439 pb a 3296782 pb)

Considerando o facto de todas as estirpes de *M. tuberculosis* e *M. bovis* analisadas apresentarem algum tipo de alteração na região intergénica dos genes *pks15* e *pks1*, o estudo desta região foi aprofundado. As alterações presentes nesta região resultam da inserção de uma guanina (G) na posição 1461 pb (como no caso de *M. bovis* AF2122/97), ou a inserção da sequência GGGCCGC entre as posições 1461 a 1468 pb (como o que se verifica em *M. tuberculosis* 49-02). No primeiro caso, a inserção de um único nucleótido origina um novo aminoácido, glicina (G), e afeta a grelha de leitura a jusante. Este é o perfil típico da espécie *M.*



*bovis* e presente em todas as sequências de *M. bovis* analisadas. No segundo caso, a inserção de sete nucleótidos origina um novo codão para glicina (G), como a inserção de mais dois codões para glicina (G) e arginina (R). Em qualquer um dos cenários, as sequências nucleotídicas passam a codificar aminoácidos diferentes dos identificados na sequência de referência (Fig.4.11.). No caso de um perfil idêntico ao de *M. tuberculosis* H37Rv, existe um codão *STOP* prematuro, o que provoca a interrupção da grelha de leitura a montante do gene *pks1* e domínios associados.

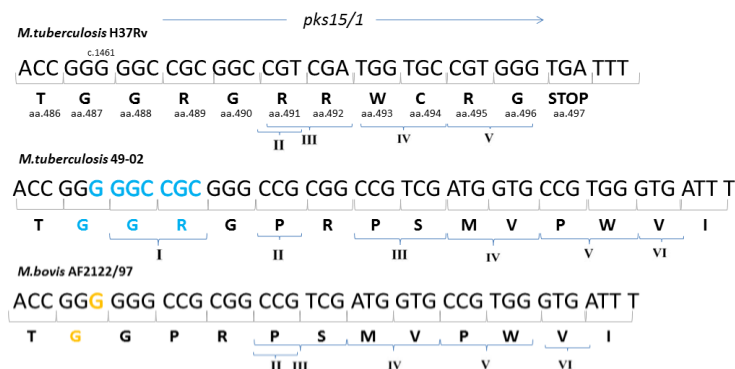


Figura 4.11: Representação das sequências nucleotídicas e aminoácídicas deduzidas das regiões correspondentes à extremidade 3' do gene *pks15* e 5' do gene *pks1* em várias estirpes selecionadas de entre os perfis analisados para polimorfismos. O destaque colorido representa a inserção de um nucleótido e sete nucleótidos observado em estirpes com uma única sequência de DNA codificante para *pks15-1*. I: aa.488 e 489 eliminação dos aminoácidos G e R; II: aa.491 R->P; III: aa.491 R->P e aa.492 R->S; IV: aa.493 W->M e aa.494 C->V; V: aa.495 R->P e aa.496 G->W.; VI: aa.497 *STOP*->V.

Apesar de se considerar que o genoma dos membros do MTC é conservado, e considerando a similaridade assumida entre os genomas de *M. tuberculosis* e *M. bovis* que ultrapassa 99,90%, foram anteriormente descritos polimorfismos ao nível dos genes *pks15* e *pks1*, num reduzido número de isolados estudados, que causam alterações na parede celular, incluindo a ausência de PGL<sup>70</sup>.

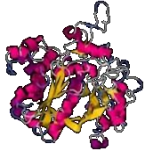
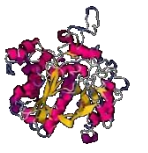

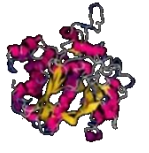
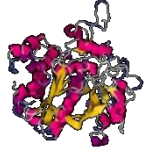
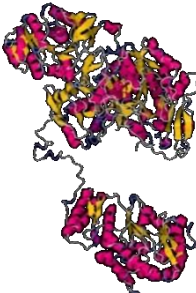
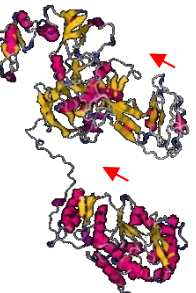
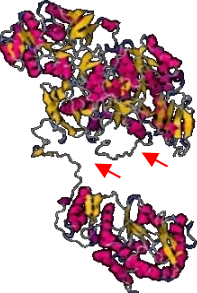
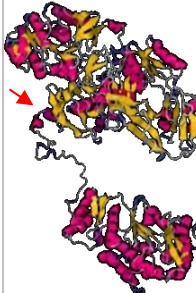
Os resultados deste trabalho, que inclui a análise do genoma de um elevado número de estirpes (mais de 100), suportam evidências preliminares descritas na literatura: *M. tuberculosis* (incluindo *M. tuberculosis* H37Rv), possui o gene *pks15-1* organizado em duas ORFs devido a uma alteração nucleotídica única na posição 1461 pb, causando uma mutação *nonsense*, não existindo produção de PGL nem função conhecida para o gene *pks1* por si só<sup>70,72</sup>.

#### 4.1.3. Modelação *in silico* da estrutura tridimensional da proteína codificada pelos genes *pks15* e *pks1* em *M. tuberculosis* e *M. bovis*

As diferenças observadas ao nível dos alinhamentos das sequências levaram à modelação e previsão da estrutura tridimensional (3D) de algumas das proteínas sintetizadas a partir de sequências aminoacídicas selecionadas para *pks15* e *pks1* (Tabela 4.7). Para modelação das estruturas 3D foram selecionadas as estirpes *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AF2122/97 por serem estirpes de referência; *M. tuberculosis* 49-02, por ser um dos isolados em que a transcrição conjunta de *pks15* e *pks1* se verifica e por apresentar um perfil idêntico a 18 das sequências de *M. tuberculosis* analisadas; e *M. tuberculosis* 0B229DS e *M. bovis* 08-08BF2, devido à presença de um codão *STOP* prematuro no domínio KR.

Tabela 4.7: Previsão *in silico* da estrutura tridimensional das proteínas Pks15 e Pks1 com base em pesquisa de homologia usando a ferramenta Phyre2. As sequências aminoacídicas das proteínas foram obtidas a partir da base de dados *TubercuList*<sup>89</sup> ou NCBI, ou deduzidas através da ferramenta (Expasy), e os modelos das proteínas foram obtidos por recurso a pesquisa de homologia na

base de dados online *Phyre2*<sup>96</sup>. As estruturas foram modeladas em modo normal e cobriram entre 83% e 93% da sequência, com 100% de confiança. A estrutura encontra-se colorida segundo a sua estrutura secundária: rosa: hélice- $\alpha$ ; roxo: hélice- $\pi$ ; amarelo: folha- $\beta$ ; azul: volta- $\beta$ .

Proteína	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> 49-02	<i>M. tuberculosis</i> 0B229DS	<i>M. bovis</i> AF2122/97	<i>M. bovis</i> 08-08BF2
Pks15	 Cob.:84%	 Cob: 85%	 Cob: 83%	 Cob: 85%	 Cob: 85%
Pks1	-	 Cob: 84%	 Cob: 84%	 Cob: 84%	 Cob: 93%

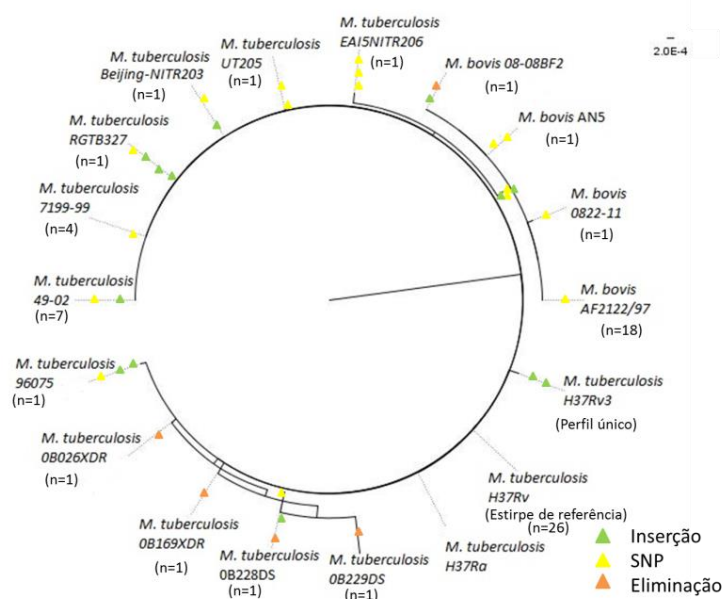
A modelação realizada a partir da sequência de aminoácidos das estirpes em análise sugere que, ao nível da proteína Pks15, o polimorfismo presente em *M. tuberculosis* 0B229DS leva aparentemente a alterações ao nível da conformação tridimensional da proteína, considerando-se que a mutação não conservativa que leva à alteração de uma prolina (com carga neutra) para uma arginina (carregada positivamente) faz com que, ao invés de uma hélice- $\pi$ , se forme uma hélice- $\alpha$ . Por outro lado, *M. tuberculosis* H37Rv não apresenta a região do domínio funcional correspondente à tradução do transcrito do gene *pks1*. *M. tuberculosis* 0B229DS apresenta diversas regiões com alterações, com diversas hélices- $\alpha$  ausentes na sua conformação. *M. bovis* AF2122/97 e outras estirpes com idêntico perfil, com apenas dois polimorfismos face a *M. tuberculosis* H37Rv (V->G, que são aminoácidos com propriedades semelhantes entre si; e A->C, em que A é apolar e afipática e C polar e neutra) apresentam uma folha  $\beta$  extra e uma estrutura menos fechada. *M. bovis* 08-08BF2, que possui um codão *STOP* prematuro ainda no domínio KR, apresenta também a estrutura tridimensional de Pks1 alterada, com uma nova hélice- $\alpha$  formada, sendo também a estrutura tridimensional com maior percentagem de cobertura por parte do sistema usado na modelação.

O facto de se detetarem menos diferenças nas estruturas tridimensionais obtidas face ao esperado poderá resultar do processo de modelação utilizado, que resulta da pesquisa de homologia nas bases de dados. Acresce ainda que, neste caso, os modelos representados correspondem a apenas 83%-93% do total da sequência. Assim, e apesar de existirem diferenças nos perfis aminoácidos de duas estirpes, o processo de modelação assume o mesmo modelo para ambos como sendo o mais semelhante à sequência em estudo.

#### 4.1.4. Análise da microevolução dos genes *pks15* e *pks1* em isolados de *M. tuberculosis* e *M. bovis* com base nas respetivas sequências nucleotídicas

Para exploração do padrão microevolutivo dos genes *pks1* e *pks15*, foi realizado um cladograma com recurso aos alinhamentos dos 18 perfis nucleotídicos distintos (14 *M.*

*tuberculosis* e quatro *M. bovis*) identificados na anterior análise. Os alinhamentos foram obtidos através do programa ClustalX e editados no programa Figtree. Os SNPs, eliminações e inserções foram representados em cada ramo ou nó usando um código de cores (Fig.4.12).



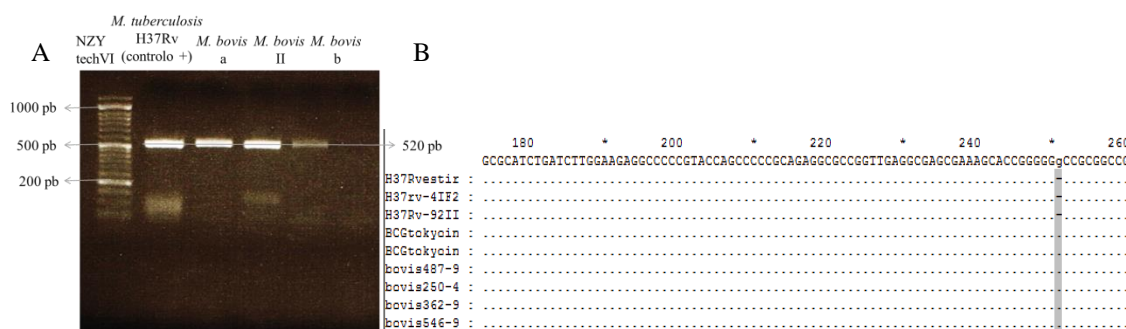
**Figura 4.12: Cladograma representativo da distribuição de acontecimentos genômicos nos genes *pks15* e *pks1*.** Foram caracterizadas 68 estirpes (*M. tuberculosis* H37Rv (estirpe referência), *M. tuberculosis* H37Ra e todas as que registavam pelo menos uma alteração nos genes *pks15* ou *pks1* quando comparadas com H37Rv). As anotações de inserções, eliminações e SNPs são registradas em relação à primeira base da sequência codificante para a primeira ORF, *pks15*, e o valor de n representa o número absoluto de estirpes com o perfil identificado. Árvore construída por recurso a ClustalW 2.1 e Figtree v1.4.2.

Em *M. bovis*, a sequência do gene *pks15-1* é conservada na maioria das estirpes analisadas, sendo que a estirpe *M. bovis* AF2122/97 tem um perfil idêntico a 86 % das estirpes *M. bovis* analisadas, enquanto as estirpes de *M. tuberculosis* apresentam maior grau de variação nos genes analisados, refletida pelo número de diferentes perfis observados, como pela percentagem de estirpes associadas a cada perfil. Por exemplo, o perfil da estirpe de referência só é idêntico a cerca de metade das estirpes de *M. tuberculosis* disponíveis. Estes resultados sugerem diferentes padrões de microdiversidade e, consequentemente, diferentes cenários microevolutivos dos genes *pks15* e *pks1* em *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Por um lado, a elevada similaridade de *M. bovis* sugere a presença de uma pressão seletiva para conservar os genes *pks15* e *pks1*, o que por sua vez pode sugerir uma função importante para a proteína *in vivo*. Por outro lado, as estirpes de *M. tuberculosis* apresentam vários SNPs, inserções e eliminações dispersas ao longo dos genes e em diferentes ramos microevolutivos, o que muitas vezes resulta num perfil polimórfico único, sugerindo que esta zona está possivelmente sujeita a seleção purificante, possivelmente refletindo a adaptação geográfica e adaptação do agente patogénico aos hospedeiros, o que reforça a possibilidade dos produtos dos genes *pks15* e *pks1* exercerem um papel crucial na interação com o hospedeiro. Contudo, a presença de vários polimorfismos que, aparentemente, conduzem a uma proteína não funcional, sugere também um cenário de pseudogenização desta região genómica em estirpes contemporâneas de *M. tuberculosis*.

## 4.2. Análise de polimorfismos da região intergênica dos genes *pks15* e *pks1* em isolados de campo de *M. bovis*

As características da região intergênica dos genes *pks15* e *pks1* evidenciadas na análise bioinformática realizada no âmbito deste trabalho (reduzida dimensão, elevada percentagem de polimorfismos identificados e número de estirpes afetadas) suscitaram interesse para caracterização experimental desta região do genoma em isolados de campo de *M. bovis* obtidos em Portugal. Os isolados foram selecionados de entre 718 disponíveis, tendo por base: o spoligotipo (SB0121- perfil mais comum na população de isolados de *M. bovis* da Península Ibérica; e o perfil MIRU-VNTR para oito *loci* (VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB 11a, QUB 11b, MIRU 4, MIRU 26); o ano de isolamento (deu-se preferência a estirpes mais recentes); hospedeiro e região geográfica (deu-se preferência a isolados de diferentes espécies animais e localidades).

Assim, amplificou-se a região intergênica entre *pks15* e *pks1* situada entre as posições 3284313 e 3284839 do genoma, a partir do DNA total dos isolados. O produto de PCR foi submetido a uma eletroforese, e os fragmentos com dimensões correspondentes à pretendida (520 pb) foram extraídos, purificados e quantificados. Foram sequenciados 25 amplicões provenientes de um isolado de referência de *M. tuberculosis* (controlo) e 24 isolados de *M. bovis* (Fig. 4.13).



**Figura 4.13:** Principais resultados da análise de polimorfismos da região intergênica dos genes *pks15* e *pks1* em isolados de campo *M. bovis*. A: Imagem de gel de electroforese com destaque para o fragmento com dimensões correspondentes ao amplicão da região intergênica de *pks15* e *pks1*. Gel de agarose a 1,5%, 90 V, 1h15m. B: Alinhamento (realizado no programa GeneDoc 2.7.000) das sequências nucleotídicas de amostras de campo selecionadas, com destaque para a região de diferença entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* (a sombreado). Foi utilizada como sequência consenso a estirpe *M. bovis* AF2122/97.

Após comparação dos resultados experimentais com as sequências previamente analisadas, confirmou-se nos isolados nacionais a presença do polimorfismo típico de *M. bovis*, correspondente à inserção de G na posição 265 (correspondente à posição 1461 quando sobreposta à sequência total dos genes *pks15-1*) do amplicão em todas as sequências dos isolados de *M. bovis* quando comparadas com a de *M. tuberculosis* H37Rv. Na edição das sequências (*BioEdit* 7.2.5) verificou-se a presença de um nucleótido indeterminado na posição oito em *M. bovis* 56, não se registando outras alterações nos restantes isolados testados.

## 4.3. Avaliação da resposta fisiológica de micobactérias selecionadas a condições de stresse ambiental que mimetizam o ambiente do hospedeiro: efeito no crescimento em descontínuo e na formação de biofilme *in vitro*

A avaliação indireta da quantidade de biofilme formado, em diferentes condições de crescimento que potencialmente mimetizam o ambiente dentro do hospedeiro, foi realizada com base no método descrito por O'Toole *et al.* (1999), que inclui o crescimento dos

microrganismos em suspensão em microplacas e coloração das células aderidas à superfície abiótica com violeta cristal. As concentrações dos compostos utilizados na suplementação dos diferentes crescimentos realizados podem ser consultadas na Tabela 3.2. Após estudos preliminares realizados em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e *M. bovis* BCG Tokyo, de entre os vários isolados de *M. bovis* cuja região intergênica de *pks15* e *pks1* foi sequenciada, incluíram-se entre dois a quatro nos ensaios de crescimento em biofilme em diferentes condições ambientais. Não se testaram os mesmos efeitos na estirpe *M. tuberculosis* H37Rv, uma vez que, até ao final do trabalho experimental conducente à presente dissertação, não se encontrava disponível no laboratório.

Os crescimentos foram realizados em meios de cultura quimicamente definidos, tendo-se testado o efeito de diferentes compostos xenobióticos. Nos ensaios realizados em microplacas não foi usada agitação para se mimetizar o ambiente do hospedeiro e a utilização de Tween<sup>®</sup> 80 como agente dispersante foi também dispensada. Para avaliar uma possível associação entre as variáveis estudadas (biofilme e sobrevivência), efetuou-se uma análise de regressão linear e utilizou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e respetivo coeficiente de correlação ( $r$ ).

O acompanhamento do crescimento da população microbiana em descontínuo foi também avaliado sob a forma de curva de crescimento, que permite estimar, direta ou indiretamente, a biomassa acumulada ao longo do tempo, possibilitando a quantificação da taxa específica de crescimento. Para *M. bovis* II, testaram-se as diferentes condições ambientais incluídas na análise da formação de biofilmes, e de entre as condições testadas, selecionou-se para cada composto a concentração que exerceu um efeito mais pronunciado ao nível da formação de biofilme.

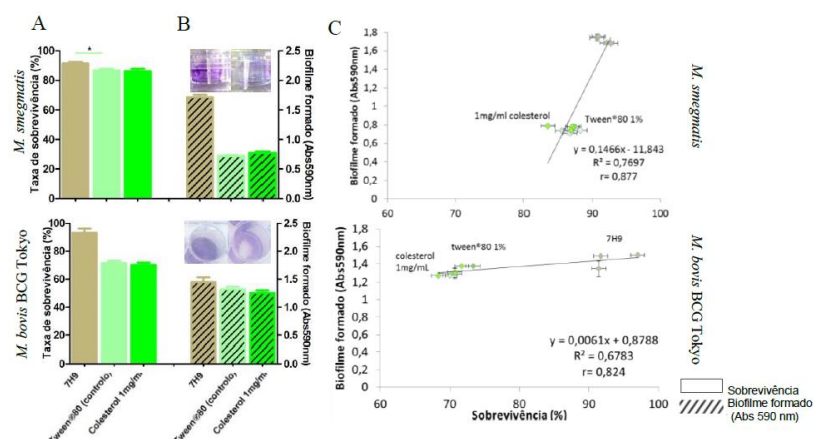
#### **4.3.1. Efeito de stresses ambientais na formação de biofilmes e sobrevivência celular em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo**

##### **4.3.1.1. Efeito exercido pelo colesterol**

A entrada das micobactérias nos fagócitos é realizada através de domínios ricos em colesterol presentes na membrana eucariota<sup>100</sup>. O colesterol tem sido associado à tuberculose pelo seu papel no processo de inibição da fusão do fagossoma com lisozimas ao permitir o recrutamento ativo da proteína TACO, associada à prevenção da fusão do fagolisossoma<sup>64,111</sup>, e por contribuir para a persistência do microrganismo ao ser usado como fonte energia pelas micobactérias durante o enclausuramento no granuloma<sup>62,100</sup>.

Neste trabalho, estudou-se o efeito da presença do colesterol no crescimento celular de micobactérias selecionadas e na formação de biofilmes. A solubilização de colesterol foi efetuada com recurso a Tween<sup>®</sup> 80 a 1% (v/v), tendo o meio 7H9 com Tween<sup>®</sup> 80 1% (v/v) sido utilizado como controlo.



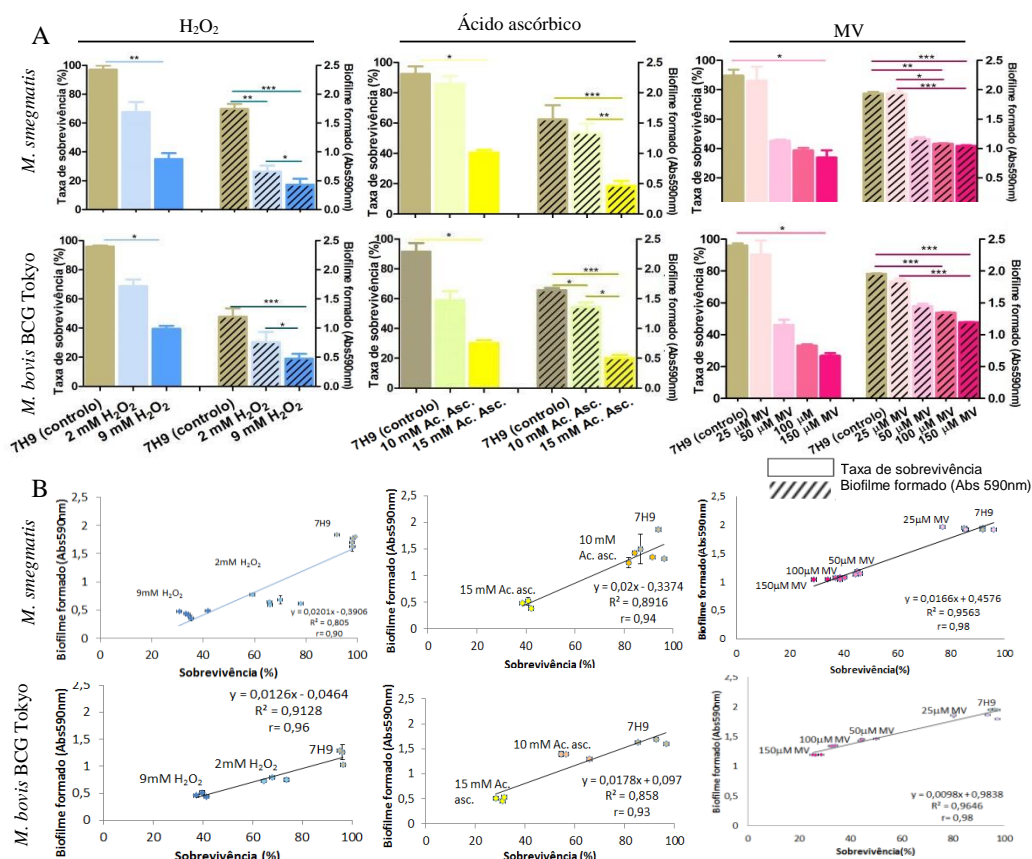


**Figura 4.14: Efeito exercido pelo colesterol na formação de biofilmes e sobrevivência em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo**  
A: Quantificação e comparação da quantidade de biofilme formado e da percentagem de sobrevivência de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo na presença de colesterol (1 mg/ml) solubilizado em Tween®80, ou na presença de Tween®80. Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de três experiências independentes. B: Representação do crescimento em microplaca na presença de 7H9 (esquerda) ou Tween® 80 (direita). C: Correlação entre a percentagem (%) de sobrevivência e biofilme formado na presença de 1 mg/ml colesterol, Tween®80 1%, e 7H9. A cada condição foi atribuída uma cor, correspondente às utilizadas nos demais gráficos de análise da condição (castanho-> 7H9, verde claro-> Tween®80 1%, verde escuro-> colesterol 1mg/ml), e identificadas as suas posições relativas no gráfico C.

Nestas condições, tanto para *M. smegmatis* como *M. bovis* BCG Tokyo, não se verificaram diferenças significativas nos valores médios de Abs<sub>590 nm</sub> e da sobrevivência na presença de colesterol face ao crescimento em 7H9 suplementado com Tween®80, notando-se, no entanto, diferenças em relação ao comportamento exibido por *M. smegmatis* na presença de 7H9 sem suplementos (Fig. 4.14), assumindo-se a hipótese de os resultados observados se deverem mais à presença de Tween®80 do que à ação do colesterol. Verificou-se que a percentagem de sobrevivência e a quantidade de biofilme estão positivamente associadas, quer na presença de Tween®80 ( $r=+0,88$ ) quer na presença de colesterol ( $r=+0,82$ ), pelo que maiores valores de biofilme formado estão associados a maiores percentagens de sobrevivência.

#### 4.3.1.2. Avaliação do efeito exercido por stresse oxidativo

A produção de ROIs é um dos mecanismos bactericidas dos macrófagos e para mimetizar o seu efeito *in vitro*, selecionaram-se compostos produtores destes mesmos elementos, nomeadamente peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o metil de viologénio (MV). Por outro lado, o ácido ascórbico, vulgarmente designado por vitamina C, é um composto crítico na fisiologia humana, estando envolvido em processos como a síntese de colagénio e de hormonas, e por não ser sintetizado no organismo, tem de ser ingerido<sup>112</sup>, tendo atribuídas atividades pro e antioxidantes<sup>113</sup>. Enquanto antioxidante, está aparentemente envolvido no processo de indução de genes de combate a stresse oxidativo<sup>114</sup> já o seu hipotético papel como pro-oxidante deve-se à promoção da reação de Fenton, com redução de iões férricos a iões ferrosos e produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, a qual exercerá stresse oxidativo, estando descrito que os lípidos da membrana das micobactérias são das principais macromoléculas afetadas<sup>73,76</sup>. Esta ambiguidade, assim como a sua referência enquanto coadjuvante no tratamento para a tuberculose, onde se verificou um efeito benéfico face à sua administração oral<sup>115</sup>, levou a que se incluísse o ácido ascórbico para análise da formação de biofilme e sobrevivência.



**Figura 4.15. Efeito exercido pelo peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido ascórbico, e metil de viologénio (MV) na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo.** A : Quantificação do biofilme formado e da sobrevivência de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM e 9 mM), ácido ascórbico (10 mM e 15 mM), e MV (25 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM). Os resultados apresentados dizem respeito à média aritmética de um mínimo de três experiências independentes. B: Correlação entre a percentagem (%) de sobrevivência e biofilme formado. A cada condição foi atribuída uma cor, correspondente às utilizadas nos demais gráficos de análise da condição (castanho->7H9, azul claro->2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, azul escuro->9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verde lima->10 mM ácido ascórbico, amarelo->15 mM ácido ascórbico, rosa pálido->25 µM MV, rosa->50 µM MV, rosa escuro->100 µM MV e mangenta->150 µM MV), e identificadas as suas posições relativas no gráfico B.

Na presença dos compostos testados, verificou-se que *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e *M. bovis* BCG Tokyo formam agregados celulares em suspensão e biofilmes na interface ar-líquido, sendo este visível a olho nú nas paredes do poço, quando se retirou o meio de cultura presente e as células em suspensão. A presença dos compostos oxidativos testados conduziu a uma diminuição significativa da formação de biofilmes em ambas as estirpes, naturalmente mais evidente nas concentrações mais elevadas. Para *M. smegmatis*, registaram-se diferenças extremamente significativas na dimensão de biofilmes formados na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na condição controle ( $p < 0,001$ ), registando-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores médios de Abs<sub>590 nm</sub> obtida para três experiências independentes quando as células foram expostas a 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diminuição de 1,74 para 0,66, respetivamente), enquanto na presença de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se registaram diferenças extremamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Abs<sub>590 nm</sub> de 0,43) (Fig.4.15.). Quanto ao efeito exercido na viabilidade da cultura, registou-se uma diminuição muito significativa na sobrevivência (de 97% no controle para 35% na presença de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

No caso de *M. bovis* BCG Tokyo, registou-se uma diminuição extremamente significativa da quantidade de células aderidas aos poços da microplaca na presença de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparado com o controle (diminuição da Abs<sub>590 nm</sub> de 1,2 para 0,47), o que

também se refletiu ao nível da sobrevivência (de 96% para 39%). Os resultados obtidos sugerem a resistência moderada das estirpes testadas à ação oxidante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  numa concentração 2 mM no que à sobrevivência diz respeito, sendo a sua capacidade de formação de biofilme fortemente afetada perante esta concentração. Em concentrações superiores (9 mM), a viabilidade celular é fortemente afetada e acompanhada da redução de biofilme.

A presença de 15 mM de ácido ascórbico provocou em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo diferenças significativas na taxa de sobrevivência e diferenças extremamente significativas na formação de biofilme. Em *M. smegmatis*, registou-se uma diminuição da  $\text{Abs}_{590\text{ nm}}$  de 1,56 (no controlo) para 0,47 e uma diminuição da sobrevivência de 93% para 41%, enquanto em *M. bovis* BCG Tokyo se registou uma diminuição da  $\text{Abs}_{590\text{ nm}}$  de 1,54 (controlo) para 0,5, com diminuição da percentagem de sobrevivência de 91% para 30%, concluindo-se que, no caso das duas estirpes testadas, a presença de 15 mM de ácido ascórbico prejudica a viabilidade celular e a formação de biofilme.

A presença de MV no meio de cultura provocou uma diminuição significativa do biofilme formado em *M. smegmatis* (redução da  $\text{Abs}_{590\text{ nm}}$  de 1,94, no controlo, para 1,16; 1,05 e 1,08 no caso de 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$  de MV, respetivamente). As percentagens de sobrevivência foram também significativamente afetadas na presença de 150  $\mu\text{M}$  de MV, registando-se uma redução de 89% para 34%. Em *M. bovis* BCG Tokyo registou-se diminuição da quantidade de biofilme formado perante a adição de 50  $\mu\text{M}$  de MV (de 1,95 no controlo, para 1,45), registando-se diferenças extremamente significativas perante a adição de 100  $\mu\text{M}$  de MV e a adição de 150  $\mu\text{M}$  de MV ( $\text{Abs}_{590\text{ nm}}$  de 1,35 e 1,19, respetivamente). No que à sobrevivência diz respeito, a presença de 150  $\mu\text{M}$  de MV reduziu significativamente a percentagem de sobrevivência de 95% para 27%. Ambas as estirpes são resistentes à ação de MV numa concentração de 25  $\mu\text{M}$ , registando-se diminuição acentuada de biofilme e sobrevivência quando a concentração é aumentada para 50, 100 ou 150  $\mu\text{M}$ , sendo que quanto maior a concentração, menor o biofilme formado e a percentagem de sobrevivência, provavelmente devido à elevada acumulação de ROIs no meio de cultura com a conversão de  $\text{O}_2$  em  $\text{O}_2^-$ .

#### 4.3.1.3. Avaliação do efeito exercido por nitrito de sódio

Os RNIs, tal como os ROIs, são gerados pelo sistema imunitário das células hospedeiras aquando da infeção. A presença de  $\text{NaNO}_2$  gera stresse nitrosativo em solução, tendo sido reportado noutras espécies o seu papel estimulador da formação de biofilmes<sup>117</sup>.

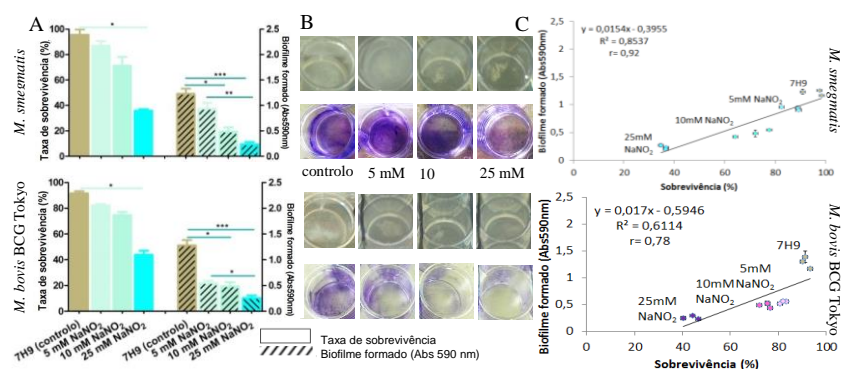


Figura 4.16: Efeito exercido pelo nitrato de sódio na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo. A: Quantificação e comparação de biofilme formado e da percentagem de sobrevivência de *M.*



Na presença de 10 mM NaNO<sub>2</sub> registou-se, para ambas as espécies, diminuição significativa ( $p<0,05$ ) da formação de biofilme: em *M. smegmatis*, diminuição de Abs<sub>590 nm</sub> de 1,22 (controlo) para 0,49, e em *M. bovis* BCG Tokyo, de 1,29 (controlo) para 0,48. A presença de 25 mM de NaNO<sub>2</sub> provocou diferenças extremamente significativas ( $p<0,001$ ) nos valores médios de Abs<sub>590 nm</sub>: redução para 0,24 em *M. smegmatis* e para 0,30 em *M. bovis* BCG Tokyo.

Os resultados obtidos sugerem que as estirpes testadas são resistentes à ação de NaNO<sub>2</sub> numa concentração 5 mM. No entanto, *M. smegmatis* é particularmente suscetível ao efeito exercido pela presença de 10 mM de NaNO<sub>2</sub>, acentuando-se ainda mais a diminuição de biofilme formado e sobrevivência quando a concentração é aumentada para 25 mM.

#### 4.3.2.1. Efeito da presença de colesterol e dos stresses oxidativo ou nitrosativo

Figura 4.17: Efeito exercido pelo nitrato de sódio, peróxido de hidrogénio e colesterol na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em *M. bovis*. A: Quantificação e comparação da quantidade de biofilme formado e da taxa de

sobrevivência dos isolados de *M. bovis* I, II, III e IV na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM e 9 mM), NaNO<sub>2</sub> (5 mM, 10 mM e 25 mM) e colesterol (1 mg/ml). Os resultados apresentados dizem respeito à média aritmética de um mínimo de duas experiências independentes. B: Correlação entre a percentagem (%) de sobrevivência e biofilme formado. Atente-se à diferença das escalas do eixo dos yy e xx nos gráficos apresentados. A cada condição foi atribuída uma cor, correspondente às utilizadas nos demais gráficos de análise da condição (castanho->7H9, verde pálido->5 mM NaNO<sub>2</sub>, verde água->10 mM NaNO<sub>2</sub>, azul->25 mM NaNO<sub>2</sub>, azul claro->2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, azul escuro->9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verde claro-> Tween®80 1%, verde escuro->colesterol 1mg/ml), e identificadas as suas posições relativas no gráfico B. A cada estirpe foi atribuído um símbolo e uma cor na linha de tendência, nomeadamente: *M. bovis* II – azul, *M. bovis* I – vermelho, *M. bovis* III – verde, *M. bovis* IV – roxo.

De forma geral, não se registaram diferenças significativas entre as diferentes estirpes de *M. bovis* durante a resposta fisiológica aos stresses impostos (Fig 4.17). Relativamente à ação do NaNO<sub>2</sub> no crescimento, os resultados obtidos, sobretudo na presença de 25 mM, sugerem um efeito extremamente significativo na formação de biofilme em todas as estirpes de *M. bovis* estudadas. Por exemplo, em *M. bovis* I, verifica-se a diminuição da Abs<sub>590 nm</sub> de 0,95, no controlo, para 0,35, com redução da percentagem de sobrevivência de 94% para 25%, em *M. bovis* II a diminuição do valor de Abs<sub>590 nm</sub> de 0,94 para 0,3, com uma diminuição da percentagem de 95% para 29%. Já em relação a *M. bovis* III, o valor de Abs<sub>590 nm</sub> diminuiu de 1,02 (controlo) para 0,32, acompanhado da diminuição da percentagem de sobrevivência de 88% para 19%, enquanto *M. bovis* IV registou uma diminuição do biofilme formado de Abs<sub>590 nm</sub> de 1,04 (controlo) para 0,29, com uma diminuição da percentagem de sobrevivência de 95% para 43%.

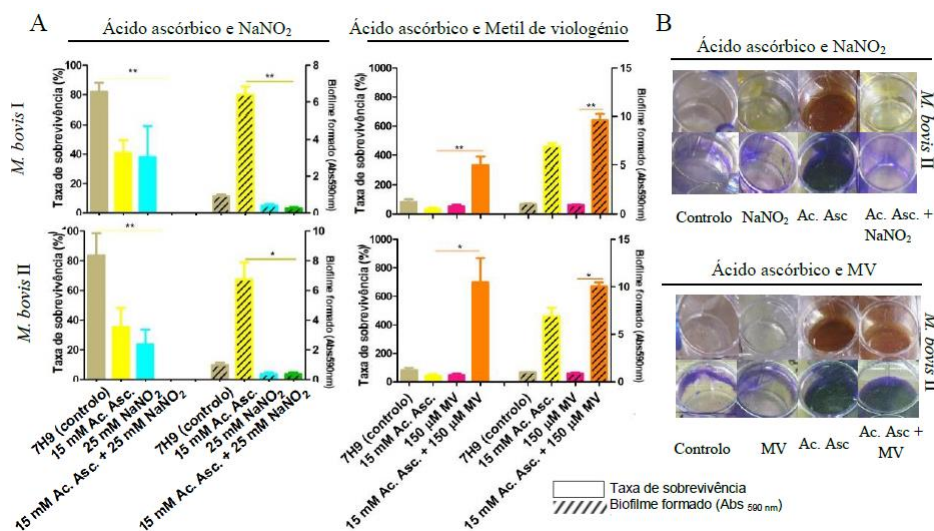
Os resultados obtidos sugerem a resistência das estirpes testadas à ação oxidante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> numa concentração 2 mM. No entanto, em concentrações superiores (9 mM), a viabilidade celular é fortemente afetada, diminuindo de forma extremamente significativa a quantidade de biofilme formado por todas as estirpes de *M. bovis*, em relação aos respetivos controlos: por exemplo, em *M. bovis* I registou-se uma diminuição de Abs<sub>590 nm</sub> 0,84 (controlo) para 0,46 e da percentagem de sobrevivência de 90% para 27%. Alguns estudos demonstram que concentrações superiores a 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio de cultura diminuem a viabilidade celular de *M. tuberculosis* e induzem a sobre-expressão de genes envolvidos na resposta ao stress, tais como *furA* e *katG* e, ainda, *ideR*, *sigH* e *sigE*<sup>117</sup>.

Relativamente ao efeito exercido pelo colesterol, apenas se registaram diferenças significativas nos valores de formação de biofilme em *M. bovis* I, com diminuição da Abs<sub>590 nm</sub> de 0,88 (controlo) para 0,56. No seu conjunto, os resultados obtidos na presença de colesterol sugerem que as diferenças observadas na formação de biofilme se devem possivelmente à presença de Tween® 80 do que a ação direta do colesterol em solução, sendo a diminuição da formação de biofilme na presença de Tween® 80 esperada, por se tratar de um dispersante que reduz a tensão superficial e que consequentemente não favorece a agregação das células.

A análise da correlação entre a percentagem de sobrevivência e o biofilme formado na presença das diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou NaNO<sub>2</sub> evidenciou uma relação linear, positivamente associada. No entanto, a “força” desta relação aparenta ser estirpe-dependente, sendo maior para *M. bovis* II e *M. bovis* IV. Contudo, considerando a ausência de diferenças significativas entre os valores registados para os diferentes isolados com o mesmo spoligotipo, os restantes stresses só foram testados em *M. bovis* I e *M. bovis* II.

#### 4.3.2.2. Avaliação do efeito da presença simultânea de ácido ascórbico e nitrito de sódio, ou ácido ascórbico e metil de viologénio

Perante os resultados anteriormente obtidos, desenharam-se experiências cujo objetivo foi testar o efeito combinado de alguns dos stresses ambientais estudados.



**Figura 4.18: Efeito exercido pelo ácido ascórbico, nitrato de sódio, ácido ascórbico e nitrato de sódio, metil de viologénio, ácido ascórbico e metil de viologénio na formação de biofilmes e na cinética de crescimento em descontínuo em *M. bovis*.** A: Quantificação e comparação da quantidade de biofilme formado e da sobrevivência de *M. bovis* I e II na presença de ácido ascórbico (15 mM), NaNO<sub>2</sub> (25 mM), ácido ascórbico (15 mM) + NaNO<sub>2</sub> (25 mM), MV (150 µM), e ácido ascórbico (15 mM) + MV (150 µM). Os resultados apresentados dizem respeito à média aritmética de um mínimo de duas experiências independentes. Atente-se à diferença das escalas do eixo dos yy nos gráficos apresentados. B: Imagem do crescimento em microplaca na presença de ácido ascórbico, NaNO<sub>2</sub>, ácido ascórbico + NaNO<sub>2</sub> (I) ou ácido ascórbico, MV e ácido ascórbico + MV(II), antes (superior) e após (inferior) o tratamento com o corante violeta de cristal.

Os resultados observados na presença de ácido ascórbico, NaNO<sub>2</sub> e em associação simultânea evidenciam uma diminuição significativa na quantidade de biofilme formado em ambas as estirpes perante a mistura dos dois compostos, com redução de Abs<sub>590 nm</sub> 0,92 (no controlo) para 0,26, em *M. bovis* I; e de Abs<sub>590 nm</sub> 0,99 (no controlo) para 0,37, em *M. bovis* II; esta tendência foi igualmente registada na percentagem de sobrevivência, onde se verificou uma diminuição de 81% para 3,4E<sup>-5</sup>% (para *M. bovis* I) e de 84% para 7,6E<sup>-5</sup>% (para *M. bovis* II) (Fig.4.18). A mistura de ácido ascórbico e NaNO<sub>2</sub> nas condições estudadas inibiu fortemente o crescimento microbiano e a formação de biofilmes, com redução drástica da sobrevivência celular. Apesar dos mecanismos de ação não serem totalmente conhecidos e de os seus efeitos sobre o crescimento das micobactérias serem descritos pela primeira vez neste trabalho, pensa-se que a mistura de NaNO<sub>2</sub> e ácido ascórbico poderá promover a genotoxicidade por oxidação do DNA<sup>118</sup>, uma vez que o ácido ascórbico reduz NO<sub>2</sub> a NO em condições ácidas, como sucede no meio 7H9 com adição de ácido ascórbico<sup>119</sup>. Este NO excessivo reage com aniões superóxido e forma peroxinitrito, com grande capacidade oxidante e de indução de danos no DNA<sup>118</sup>; além disso, poderá ativar poli (ADP-ribose) polimerases, que eliminam NAD e ATP, culminando na morte celular por necrose<sup>57</sup>.

Apesar de as diferenças visuais na sobrevivência e biofilme formado serem substanciais, o teste estatístico aplicado aos dados não apresenta as diferenças significativas intuitivamente esperadas. Este facto pode dever-se ao reduzido número de experiências independentes realizadas e à natureza do próprio pós-teste estatístico aplicado: o teste de Friedman compara a diferença entre a soma de ocorrências entre duas variáveis com a

diferença média esperada (baseada no número de grupos e no seu tamanho). Considerando os elevados valores de Abs<sub>590 nm</sub> obtido na presença de ácido ascórbico, percebeu-se que a sua presença torna a diferença média esperada entre as diferentes condições em análise muito superior às registadas entre as demais condições, alterando os níveis de significância: assim, algumas das diferenças que se registaram entre condições deixam de ser estatisticamente significativas. Assim, apesar de não ser possível retirar elações estatísticas, a adição de 15 mM ácido ascórbico parece diminuir a sobrevivência mas aumentar a produção de biofilme, enquanto que a adição de 25 mM NaNO<sub>2</sub> surge associada a uma diminuição do biofilme formado e da percentagem de sobrevivência. Já a mistura destes dois compostos exerce um efeito sinérgico bactericida.

Em relação ao efeito exercido por ácido ascórbico e metil de viologénio quando adicionados em simultâneo, os resultados contrastam com os anteriores: registou-se um aumento significativo na quantidade de biofilme formado em ambas as estirpes, em comparação com os valores obtidos na presença de apenas MV (aumento de Abs<sub>590 nm</sub> 0,93 (MV) para 9,61, para *M. bovis* I, e de Abs<sub>590 nm</sub> 0,87 (MV) para 10,05, para *M. bovis* II); esta tendência também se verificou ao nível da percentagem de sobrevivência relativamente ao crescimento exclusivamente na presença de ácido ascórbico, onde se registou um aumento de 31,5% para 324,5% face ao crescimento em condições controlo (para *M. bovis* I) e de 40,44% para 697,1% face ao crescimento em condições controlo (para *M. bovis* II).

O efeito observado na presença de ácido ascórbico em estirpes de campo de *M. bovis*, em que se verificou uma diminuição da sobrevivência e um aumento consistente do biofilme formado é distinto quando comparado com o efeito exercido em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo. Os resultados obtidos contrariam, aparentemente, dados publicados noutros estudos, que reportam a inibição severa do crescimento de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* na presença de concentrações variadas de ácido ascórbico (entre 4 a 10 mM, num período de exposição mínimo de duas horas e máximo de quatro dias)<sup>76,120</sup>. Contudo, os estudos publicados referem o efeito bactericida exercido por ácido ascórbico apenas em aerobiose, não estando publicados resultados em condições de anaerobiose<sup>76</sup>; por outro lado, não estão publicados resultados para *M. bovis*. No nosso estudo em estirpes virulentas *M. bovis*, verificou-se que na presença de ácido ascórbico, o biofilme se formou sobretudo no fundo do poço da microplaca, não havendo agregados celulares em suspensão, o que sugere que a formação de biofilmes pode estar associada à diminuição de oxigénio no meio. (Fig4.18 B).

Apesar das micobactérias serem aeróbias<sup>20</sup>, existem evidências de que a sobrevivência e crescimento de *M. tuberculosis* em anaerobiose é possível<sup>25,121</sup> tendo sido detetada nessas condições a atividade de nitrato redutase, que promove a utilização de nitrato como aceitador final de eletrões e permite a sobrevivência e proliferação em anaerobiose<sup>121</sup>. A atividade de nitrato redutase em anaerobiose aparenta ser distinta em *M. tuberculosis* e *M. bovis*, estando descrito que esta produz quantidades reduzidas de nitrito, enquanto *M. tuberculosis* reduz ativamente nitrato a nitrito<sup>122</sup>. No entanto, estudos recentes indicam que a presença de ácido

ascórbico aumenta a redução de nitrito<sup>123</sup> e a expressão do promotor de *katG* (envolvido em processos de proteção celular contra ROIs e sobrevivência em macrófagos)<sup>124</sup>.

O crescimento microbiano de *M. bovis* em meio suplementado com ácido ascórbico foi caracterizado pela formação de um sedimento externo aderido ao fundo da microplaca, onde as condições experimentais (sem agitação, três semanas, envoltos em película) favorecem um ambiente hipóxico, podendo especular-se que a presença de ácido ascórbico promoveu o crescimento celular em anaerobiose, desencadeando-se um fenótipo de crescimento em biofilme.

Em contraste, apesar de *M. bovis* BCG Tokyo apresentar o gene que codifica para nitrato redutase<sup>125</sup>, não se registou nesta estirpe o aumento substancial de biofilme verificado nas estirpes patogénicas. Estas diferenças fisiológicas entre estirpes patogénicas de *M. bovis* e a estirpe *M. bovis* BCG estudada poderão refletir diferenças a nível transcricional ou pós-transcricional que poderão vir a ser aferidas em futuros estudos.

Das três regiões de diferença que diferenciam *M. bovis* “clássico” e *M. bovis* BCG (RD1, RD2 e RD3), sabe-se que RD1 está presente em todas as estirpes patogénicas e ausente em *M. bovis* BCG e noutras espécies não patogénicas<sup>40</sup>. Esta região é constituída por nove ORFs (*Rv3870* a *3879c*), e apesar de ainda não serem conhecidas todas as funções associadas aos seus transcritos e/ou às proteínas codificadas, sabe-se que a expressão desta região está associada à produção de um complexo proteico transmembranar, ESX-1, relacionado com a troca de compostos entre o interior e o exterior da célula, entre eles CFP-10 e ESAT-6<sup>38,40,126</sup>. Apesar da presença deste sistema de secreção não ter sido ainda diretamente associado à adesão a superfícies<sup>127</sup>, sabe-se que a ausência de *Rv3874* - *Rv3875* causa alterações morfológicas nas células<sup>38</sup>, pelo que se especula que a forma como as células se associam entre si, e a superfícies, poderá estar alterada.

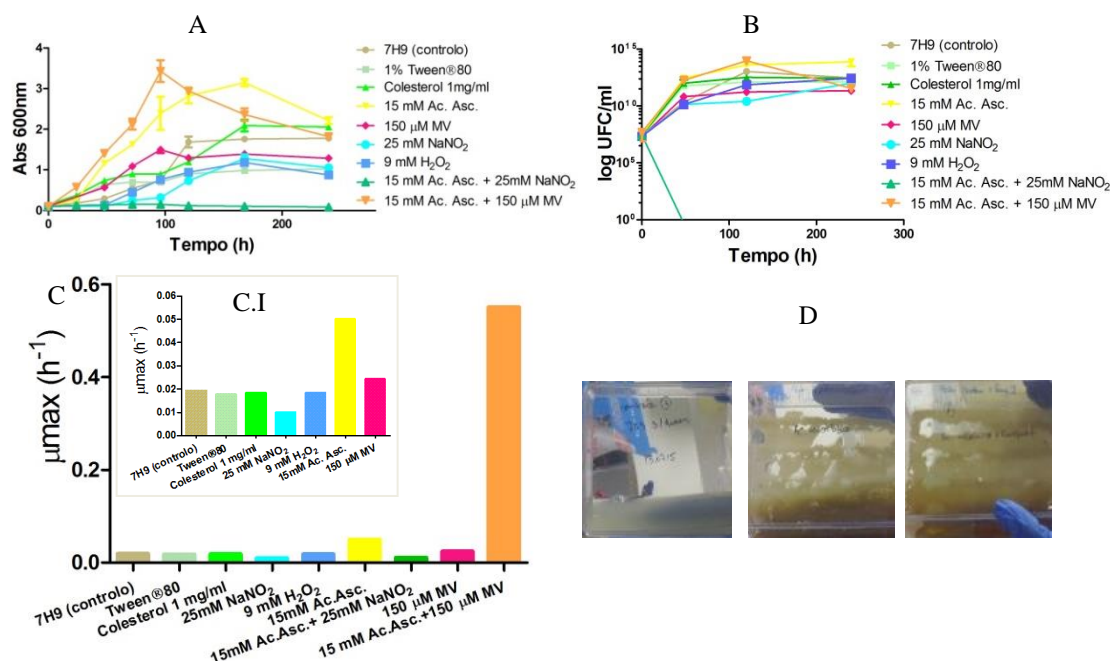
É também importante referir que o papel secretor de ESX-1 está diretamente associado à interação da célula com macrófagos, pelo que se especula que os genes incluídos na RD1 possam também encontrar-se sobre-expressos em situações de stresse<sup>55,117</sup>, nomeadamente na presença de ácido ascórbico, o que poderia explicar o aumento da formação de biofilme em estirpes de campo de *M. bovis* em condições de anaerobiose, por contraste com o comportamento exibido por *M. bovis* BCG Tokyo, que tem esta região ausente.

À semelhança dos resultados descritos para a associação de 15 mM ácido ascórbico e 25 mM NaNO<sub>2</sub>, apesar das diferenças visuais na sobrevivência e biofilme formado serem substanciais, o teste estatístico aplicado aos dados não reflete as diferenças significativas esperadas. No entanto, a adição de 15 mM ácido ascórbico parece diminuir a sobrevivência, mas aumentar a produção de biofilme, enquanto a adição de 150 µM MV surge associada a uma ligeira diminuição do biofilme formado, bem como da percentagem de sobrevivência. A mistura destes dois compostos teve como consequência um aumento substancial das células em suspensão e de produção de agregados, potenciando o crescimento, e registando-se valores de biofilme formado e de sobrevivência marcadamente superiores aos registados para a condição controlo e para a condição controlo e para o efeito isolado de 15 mM ácido

ascórbico. O biofilme formou-se sobretudo no fundo do poço da microplaca fortemente aderido à superfície da placa, pelo que à semelhança dos resultados anteriormente descritos na presença de ácido ascórbico, o crescimento nestas condições poderá estar associado à fraca disponibilidade de oxigénio no fundo da mesma, promovido pela presença de ácido ascórbico aliada ao efeito sinérgico associado à presença de MV, que promove stresse oxidativo. Apesar da escassa literatura acerca da associação destes dois compostos, foi descrita uma relação sinérgica entre ambos, em que a sua associação leva ao consumo súbito do oxigénio do meio<sup>128</sup>. Este consumo de oxigénio, ao potenciar a anaerobiose do meio, poderá exacerbar o efeito descrito aquando da presença de ácido ascórbico.

Não obstante o atrás descrito, está-se também ciente de erros experimentais associados à quantificação das células viáveis em suspensão e em biofilme aderido, uma vez que, nestas condições, não foi possível a total solubilização do biofilme devido à sua grande espessura e marcada adesão ao fundo das microplacas.

#### 4.3.3. Análise do efeito da presença de diferentes condições ambientais no crescimento celular em descontínuo de *M. bovis* II



**Fig. 4.19. Efeito no crescimento celular em descontínuo de *M. bovis* II na presença de diferentes condições ambientais.** A: Abs<sub>600 nm</sub> vs tempo; B: Concentração de células viáveis (log UFCs/ml) vs tempo. C: Taxa específica de crescimento ( $\mu_{\max}$  (h<sup>-1</sup>), incluindo os dados relativos à mistura de diferentes componentes. C.I - Taxa específica de crescimento ( $\mu_{\max}$  (h<sup>-1</sup>), excluindo os dados relativos à mistura de diferentes componentes (ácido ascórbico com NaNO<sub>2</sub> ou ácido ascórbico com MV). D: Fotografia de frascos de cultura celular de 600 ml, com destaque para o biofilme (não corado) formado. Da esquerda para a direita: *M. bovis* II em meio 7H9 piruvato, *M. bovis* II em meio 7H9 piruvato suplementado com 15 mM ácido ascórbico; *M. bovis* II em meio 7H9 piruvato suplementado com 15mM ácido ascórbico e 150 μM MV.

No caso de estirpes virulentas como *M. bovis* II, o Tween®80 evita a formação dos típicos agregados em “corda” de bacilos em suspensão, promovendo a dissolução da estrutura e potencialmente aumentando o contacto entre as células e os nutrientes disponíveis. Além disso, é também de notar que o Tween® 80 possui ácido oleico na sua composição, sendo ele próprio uma fonte de carbono para o crescimento micobacteriano<sup>129</sup>. Apesar de os resultados obtidos para a adição de colesterol apresentarem diferenças face ao controlo, a sua semelhança aos dados relativos à adição de Tween® 80 e ausência de discrepâncias entre si



pode sugerir, à semelhança do observado na formação de biofilmes e sobrevivência, que as diferenças observadas se devem principalmente à presença de Tween® 80 a 1% na solução de colesterol do que a ação direta do colesterol em solução.

A presença de NaNO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a um aumento do tempo de adaptação da cultura às condições ambientais, à redução da taxa específica de crescimento e a uma fase exponencial de crescimento mais curta (mais acentuado perante NaNO<sub>2</sub>) (Fig. 4.19). Em contraste, a presença de MV originou o aumento dos valores de biomassa durante a fase exponencial de crescimento, diminuindo na fase estacionária, o que se traduz numa taxa específica de crescimento superior face à do controlo. A presença de ácido ascórbico no meio de cultura originou maiores valores de biomassa (Abs<sub>600 nm</sub> final de 2,21) e viabilidade celular em todas as fases de crescimento (Fig.4.19.A), apenas suplantados pelos valores alcançados aquando da sua combinação com MV. Também as taxas específicas de crescimento na presença deste composto ou associado a MV foram claramente superiores aos valores registados nas restantes condições. Tal como observado nas microplacas, o crescimento microbiano de *M. bovis* em meio suplementado com ácido ascórbico caracterizou-se pela presença de um sedimento aderido ao fundo do frasco de cultura celular que se formou após 24 a 48 horas de incubação (Fig. 4.19D). Por outro lado, a associação de ácido ascórbico a NaNO<sub>2</sub> resultou na ausência de crescimento e de viabilidade celular, provavelmente devido à redução de NO<sub>2</sub> a NO em condições ácidas<sup>119</sup>, o qual reage com aniões superóxido e forma peroxinitrito, capaz de induzir extensos danos no DNA<sup>118</sup> e de estimular a morte celular por necrose<sup>57</sup>.

Quanto à viabilidade das culturas, a presença de ácido ascórbico associada a MV conduz a um aumento notável da concentração de células viáveis de 10<sup>12</sup> (controlo) para 10<sup>14</sup> UFCs/ml na fase exponencial do crescimento, verificando-se igualmente a maior taxa específica de crescimento nesta condição (0,55 h<sup>-1</sup> versus 0,02 h<sup>-1</sup> no controlo) (Fig.4.19.C). Contudo, a exposição das micobactérias a esta mistura de soluções originou uma diminuição brusca da viabilidade aquando do início da fase estacionária.

Verificou-se ainda a redução da taxa específica de crescimento de *M. bovis* II na presença de Tween® 80, colesterol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub> e ácido ascórbico combinado com NaNO<sub>2</sub>; em contraste, na presença de ácido ascórbico, MV ou ácido ascórbico combinado com MV, os valores de  $\mu_{max}$  obtidos são superiores ao do controlo.

Assim, conclui-se que a maioria das condições ambientais testadas, não sendo bactericida, apresenta um efeito bacteriostático, quando comparado com a condição controlo.

#### **4.4. Características dos perfis lipídicos da estirpe de campo *M. bovis* II quando exposta a diferentes condições ambientais**

##### **4.4.1. Análise exploratória dos solventes, misturas de eluição e protocolos**

Muitas das condições com que *M. bovis* e *M. tuberculosis* se deparam no interior do hospedeiro têm ação direta ou indireta sobre os lípidos da parede celular, os quais exercem uma função de proteção das células contra os stresses oxidativo e nitrosativo<sup>74</sup>, encontrando-se também entre os principais alvos destes stresses<sup>76</sup>. Já a presença de ácido ascórbico,

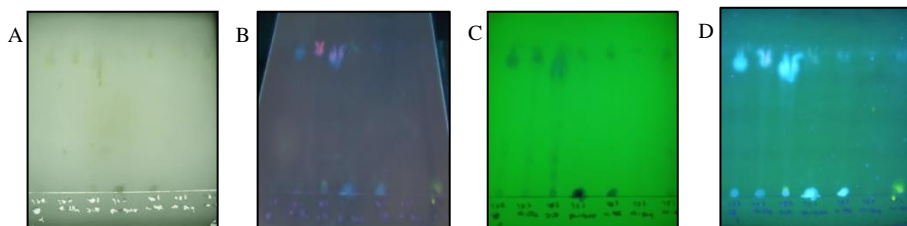
enquanto agente oxidativo, pode levar a danos ao nível dos lípidos na membrana e parede celular e disfunções na manutenção da homeostasia celular<sup>76</sup>, assim como o MV que, para além de promover stresse oxidativo, tem sido apontado por alguns estudos como potenciador de peroxidação de lípidos<sup>73</sup>. Por sua vez, o colesterol, para além de ter um papel fundamental no processo de internalização nos macrófagos, é importante como fonte de carbono e na própria produção de lípidos da parede celular<sup>64,75</sup>.

Assim, neste trabalho tentou determinar-se o perfil lipídico de *M. bovis* durante o crescimento em condições selecionadas. Exploraram-se diversas misturas de extração de lípidos, variando-se proporções relativas e testou-se a mistura de eluição mais eficaz para a análise de lípidos em TLC. Realizaram-se três protocolos de extração, e testaram-se onze soluções de eluição distintas, tendo-se verificado que o protocolo mais eficaz é semelhante ao descrito por Constant e colaboradores em 2002<sup>72</sup>, constituído pela mistura de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), metanol (CH<sub>3</sub>OH) e água (H<sub>2</sub>O) em proporções variáveis ao longo do processo de extração, o qual favorece a extração de lípidos apolares<sup>68</sup>, e da mistura CHCl<sub>3</sub> /CH<sub>3</sub>OH (95:5, v/v) para eluir os lípidos durante a TLC. Procedeu-se à extração de lípidos celulares totais a partir de culturas *M. bovis* II em fase estacionária e posterior análise por TLC.

#### 4.4.2. Análise dos lípidos celulares de *M. bovis* II por TLC

A análise por TLC permite avaliar os compostos presentes em determinada amostra quanto à sua afinidade para uma fase estacionária polar (placa de sílica) relativamente a uma fase móvel (neste caso CHCl<sub>3</sub> /CH<sub>3</sub>OH (95:5, v/v)), pelo que quanto mais polares forem os lípidos presentes em solução, mais irão aderir à placa de sílica ou migrar uma distância reduzida na placa, e quanto mais apolares forem, mais se irão deslocar com a fase móvel ao longo da placa<sup>130</sup>. Esta técnica permite uma análise preliminar da polaridade dos diversos elementos. A afinidade pode ser avaliada por comparação direta entre pontos observados, ou através do cálculo do fator de retenção ( $Rf = \frac{\text{distância percorrida pelo composto}}{\text{distância percorrida pela frente de solvente}}$ ). Para se averiguar se existiam diferenças nos perfis lipídicos das células quando estas são cultivadas em diferentes condições ambientais, extraiu-se os lípidos das células crescidas na presença de 100 mM nitroprussiato de sódio (NS), um agente que gera stresse nitrosativo, e comparou-se com o perfil obtido na presença de 25 mM NaNO<sub>2</sub>. A extração de lípidos celulares de células crescidas na presença de colesterol 1 mg/ml e Tween®80 1% não foi realizada. A amostra crescida na presença de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradou antes de ser possível a sua análise.

##### 4.4.2.1. Perfil lipídico total



**Figura 4.20: Análise por TLC de lípidos celulares de *M. bovis* II extraídos de meios quimicamente distintos.** As quatro fotografias representam a mesma placa, revelada sob diferentes comprimentos de onda (A:luz branca, B:302 nm (UV-B), C: 254 nm D:366 nm). Da esquerda para a direita: Controlo + (7H9piruvato), 25 mM NaNO<sub>2</sub>, 100 mM NS, 15 mM ácido ascórbico, 15 µM MV, 15 mM ácido ascórbico+15 µM MV, 15 mM ácido ascórbico + 25 mM NaNO<sub>2</sub>. Placa de sílica activada a 100 °C, 1 h. Lípidos dissolvidos em CHCl<sub>3</sub> e eluídos em CHCl<sub>3</sub> /CH<sub>3</sub>OH (95:5, v/v).



Os diferentes comprimentos de onda aplicados para visualização dos lípidos migrados na placa de sílica possibilitaram uma análise diferencial dos lípidos presentes (Fig. 4.20A). Esta análise preliminar permitiu verificar que o crescimento em condições distintas provoca alterações visíveis ao nível do tipo de lípidos formados, demonstrado quer pelo perfil lipídico aparente na placa revelada a  $\lambda=254$  nm (Fig. 4.20C), quer pelas alterações na mobilidade e cor exibidas pela placa revelada a  $\lambda=302$  nm (Fig. 4.20 B), onde cores distintas indicam a presença de elementos químicos diferentes.

#### 4.4.2.2. Presença de PGL



**Figura 4.21: Análise por TLC de lípidos celulares de *M. bovis* II.** A: 7H9 (Controlo), B: 25 mM NaNO<sub>2</sub>, C: 100 mM NS, D: 15 mM ácido ascórbico, E: 15 mM MV, F: 150 µM MV + 15 mM ácido ascórbico G: 25 mM NaNO<sub>2</sub> + 15 mM ácido ascórbico. As setas representam manchas lipídicas distintas das identificadas relativamente ao perfil do controlo positivo. A região onde é esperada a mancha correspondente a PGL está identificada [PGL]. Placa de sílica revelada sob luz UV  $\lambda=254$  nm. Placa de sílica ativada a 100 °C, 1 h. Lípidos dissolvidos em CHCl<sub>3</sub> e eluídos em CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (95:5, v/v).

A zona para identificação de PGL foi determinada com base na análise visual de placas de TLC presentes noutros trabalhos publicados, em que a técnica de TLC foi efetuada com os mesmos eluentes<sup>72</sup>. Na mistura de solventes aplicada, PGL foi identificado com Rf=0,42 (Fig.4.21). Considerou-se ter identificado os lípidos celulares correspondentes a PGL nas condições de crescimento do controlo, na presença de 25 mM NaNO<sub>2</sub>, e na presença de 100 mM NS.

**Tabela 4.8: Valores de Rf registados durante a análise por TLC dos lípidos celulares obtidos durante o crescimento em condições selecionadas.** Os valores de Rf foram calculados considerando o ponto valor médio da distância percorrida.

Controlo	NaNO <sub>2</sub>	NS	MV	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico +MV	Ácido ascórbico +NaNO <sub>2</sub>
0,83	0,22	0,12	0,22	0,29	0,31	0,26
-	0,28	0,22	-	-	0,91	0,9
-	-	0,28	-	-	-	-
-	-	0,79	-	-	-	-

A análise do fator de retenção permitiu verificar que existem, também a este nível, perfis lipídicos distintos. As características dos lípidos extraídos das células cultivadas na condição controlo ou com suplementação de 150 µM MV e 15 mM ácido ascórbico levaram a que grande parte dos lípidos se mantivesse junto ao ponto de aplicação inicial; já o crescimento na presença de 100 mM de NS ou 15 mM ácido ascórbico combinado com 150 µM MV apresentaram perfis únicos, com Rfs distintos dos demais registados (Tabela 4.8). Analisaram-se em par os perfis obtidos na presença de 100 mM NS e na presença de 25 mM NaNO<sub>2</sub>, bem como na presença de 150 µM MV e de 15 mM ácido ascórbico, uma vez que, de uma perspetiva celular, provocam o mesmo tipo de stresse. Verificou-se que os perfis lipídicos obtidos em condições de cultura caracterizadas pelo mesmo tipo de stresse são diferentes, o que sugere um efeito específico dos compostos testados. É também de realçar que foi na presença destes compostos que se registou a maior incidência de lípidos polares: nos casos da suplementação com NS ou NaNO<sub>2</sub> eram distinguíveis várias manchas numa fase muito precoce do arrastamento; na presença de ácido ascórbico e MV, os compostos identificados não se deslocaram do ponto de aplicação original.

Considerando a natureza dos solventes utilizados para a extração lipídica e TLC, era expectável que a maioria dos lípidos analisados tivesse uma polaridade reduzida ou fossem mesmo apolares, tendo uma maior afinidade para o clorofórmio do que para o metanol e água presentes na solução. Assim, o arrastamento verificado em todas as amostras junto à frente de solvente representa possivelmente os lípidos apolares que, não tendo qualquer afinidade para a placa de sílica, foram arrastados na frente do clorofórmio. A presença de manchas no ponto de aplicação original sugere que alguns dos compostos resultantes da extração possuem mais afinidade para a placa de sílica do que para a solução, sendo polares. As diferenças registadas entre as diferentes condições estudadas e o controlo demonstram que os compostos adicionados aos meios de cultura interferem com os lípidos da parede celular, formando compostos diferentes relativamente ao controlo.

PGL, sendo um lípido complexo<sup>131</sup>, interage com um conjunto de solventes com polaridades distintas, tendendo a ser extraído em conjunto com lípidos apolares<sup>68</sup>. As diferenças observadas nos diferentes perfis lipídicos gerados por algumas das amostras recolhidas podem ter várias explicações: i) o PGL produzido por células sujeitas a diferentes condições ambientais adquire composição e características químicas distintas que se refletem ao nível da sua polaridade e capacidade de migração nas condições-padrão; ii) as alterações ao nível dos lípidos da parede celular podem refletir-se no processo de extração, o que poderá implicar uma extração parcial dos compostos lipídicos presentes, e distinta entre diferentes condições; iii) por último, pode ainda dever-se a uma questão de concentração da amostra, uma vez que apesar de se partir de um volume inicial semelhante, todo o processo está sujeito a perdas consecutivas, que se poderão ter acentuado em algumas das amostras extraídas. Assim, apesar de se aplicarem volumes iguais de amostra em cada ponto da placa de sílica, os mesmos poderão não corresponder à mesma concentração.

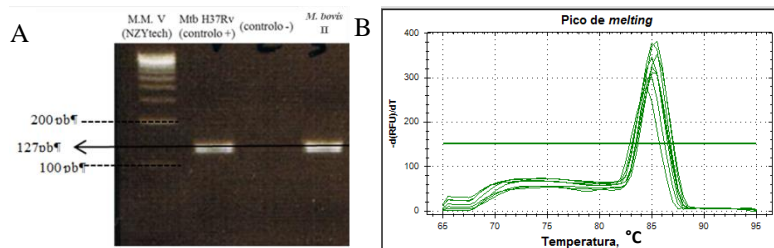
#### **4.5. Análise do perfil de expressão genética dos genes *pks15* e *pks1* durante o crescimento em descontínuo de *M. bovis* em condições de crescimento selecionadas**

Especula-se que as alterações ao nível dos lípidos expostos à superfície celular, nomeadamente ao nível de PGL, possam condicionar a adesão à superfície e a formação de biofilmes<sup>68,76</sup>. Considerando os estudos efetuados neste trabalho, testou-se o efeito do crescimento sob diferentes stresses na expressão de genes associados à produção de PGL, nomeadamente os genes *pks15* e *pks1*.

##### **4.5.1. Quantificação relativa de transcritos de *pks15* e *pks1* por RT-qPCR**

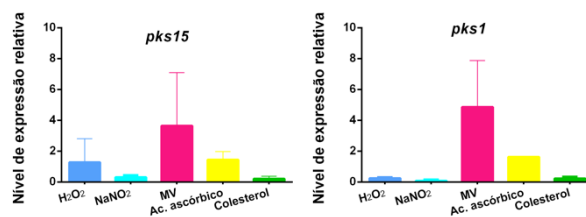
Após extração do RNA total de células cultivadas sob diferentes condições ambientais, digestão com DNAase e quantificação do RNA por fluorimetria, analisou-se a expressão dos genes *pks1* e *pks15* pela técnica de RT-qPCR. Usaram-se *primers* específicos desenhados no presente estudo para amplificação da extremidade 3' dos genes de interesse, e efetuou-se a quantificação relativa dos seus níveis de expressão pelo método aproximado de  $\Delta\Delta C_t$ , usando como controlo endógeno o gene 16S rDNA, e usando como amostra calibradora a condição controlo (sem stresse). Para otimização das condições reacionais, testaram-se inicialmente várias concentrações de *primers* e de magnésio, temperaturas de hibridação e analisou-se o

perfil das curvas de dissociação, usando PCR convencional e em tempo real. As reações de padronização evidenciaram a amplificação de um único fragmento em todos os genes (Fig.4.22A) e com a temperatura de dissociação esperada (Fig.4.22B). Seguiu-se a quantificação dos níveis de expressão por RT-qPCR, realizado num só passo, usando como molde o RNA extraído de culturas submetidas às diferentes condições em análise.



**Figura 4.22: Quantificação relativa de transcritos de *pks15* e *pks1* por RT-qPCR** A: Gel de eletroforese com destaque para o fragmento com dimensões correspondentes ao amplicão da região 3' do gene *pks1*. Gel de agarose a 1,5%, 90 V, 1 h 15 m. A banda de 127 pb corresponde ao amplicão da região 3' do gene *pks1*. B: Exemplo de curva de *melting* e análise de pico de *melting* em RT-qPCR para os genes *pks15* e *pks1* e 16S em diferentes condições que simulam o interior do hospedeiro.

Os níveis de expressão dos genes *pks15* e *pks1* em cada uma das condições de estudo foram obtidos após normalização com o nível de expressão do gene *16S rDNA*, determinado para cada condição em estudo, e analisando-se sempre as curvas de dissociação obtidas para aferir da especificidade das reações de amplificação (Fig.4.23).



**Figura 4.23: Expressão relativa dos genes *pks15* e *pks1*, determinada por RT-qPCR em *M. bovis* II, quando crescida na presença de diferentes compostos.** Gene de referência: *16S rRNA*; Amostra calibradora: crescimento em paralelo em 7H9; os resultados apresentados dizem respeito à média aritmética de um mínimo de três experiências independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

Verificou-se a alteração dos níveis relativos de expressão dos genes *pks15* e *pks1* nas várias condições estudadas, com aparente sobre-expressão dos mesmos na presença de todas as condições, nomeadamente na presença de 150  $\mu$ M MV (2,69 e 4,37 vezes, respetivamente) e de 15 mM de ácido ascórbico (1,40 e 1,63 vezes, respetivamente), verificando-se ainda a concordância do aumento relativo dos níveis de expressão nos dois genes em simultâneo para todas as condições. Estes resultados reforçam tanto a possibilidade destes dois genes serem transcritos em conjunto, como a de desempenharem um papel importante na resposta a stresses ambientais.

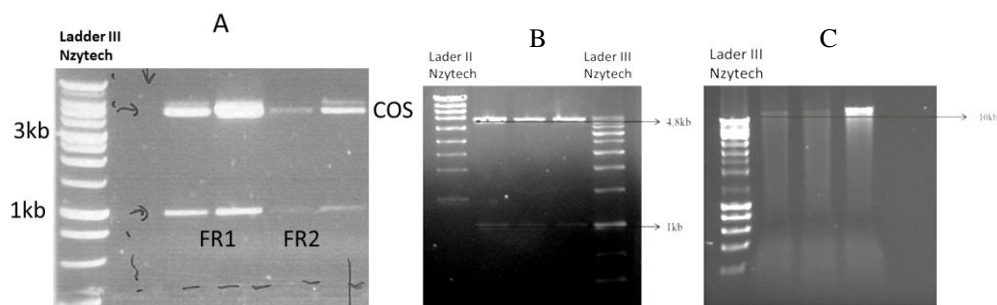
Os resultados obtidos para o nível de expressão perante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub> e colesterol não são concordantes com os resultados de *microarrays* descritos na literatura<sup>132,135</sup> o que se pode dever a diferenças experimentais, como diferentes tempos de exposição das micobactérias aos compostos, assim como ao facto dos estudos por *microarrays* terem sido realizados durante a fase exponencial do crescimento das espécies em estudo, e com recurso a *M. tuberculosis*. Considerando que os resultados da atividade experimental foram realizados com base em culturas expostas ao stresse durante 48 h e já em fase estacionária, é plausível que o microrganismo consiga desenvolver um mecanismo de adaptação ao stresse neste período de tempo distinto do registado na fase exponencial, tendência registada noutros estudos em

*Mycobacterium* spp.<sup>133,134</sup> e que poderá explicar a fraca expressão relativa detetada perante alguns compostos. Os estudos anteriormente publicados referentes a anaerobiose<sup>132,134</sup> demonstram que a presença de diferentes compostos pode influenciar a resposta dos genes em estudo, pelo que a análise da expressão génica de *pkc15* e *pkc1* perante diferentes combinações de condições é uma das perspetivas futuras a estudar. Para o ácido ascórbico e MV não existiam, tanto quanto se conseguiu averiguar, dados publicados na literatura relativos à sua influência na expressão genética de *M. tuberculosis* ou *M. bovis*, sendo os resultados aqui apresentados descritos pela primeira vez.

#### 4.6. Construção de um mutante de eliminação de *pkc1* por transdução especializada

Uma das abordagens para estudo da associação entre o genótipo e o fenótipo foi a construção de um mutante de eliminação por transdução especializada<sup>136</sup>, específico para o gene *pkc1* que, por comparação à estirpes selvagem, permitiria inferir acerca da ação direta deste gene na formação de biofilmes e na sua capacidade de sobrevivência<sup>70</sup>. Contudo, até ao final da componente experimental deste trabalho não se conseguiu concluir todos os passos do fluxograma subjacente.

Realizou-se a amplificação de dois fragmentos com cerca de 1200 pb do gene *pkc1* (Fig.4.24.A) com *primers* especificamente desenhados para o efeito, clonou-se as regiões a montante e jusante do gene *pkc1* no vetor pYUB854 (com aproximadamente 4800 pb) (Fig.4.24.B), e efetuou-se a sua posterior ligação ao fagemídeo phAE159 (com aproximadamente 50 kb), confirmando-se a ligação pela presença de uma banda superior a 10 kb (Fig.4.24.C).



**Figura 4.24. Géis representativos de diferentes etapas do processo de construção de um mutante de eliminação do gene *pkc1* por transdução especializada.** A: DNA plasmídico resultante de uma transformação em *E. coli*: confirmação da ligação entre cosmídeo pYUB854 com o amplicão da região 5' do gene *pkc1* (FR1 - 983 pb) e o amplicão da região 3' do gene *pkc1* (FR2 - 954 pb). B: Gel de agarose a 1%, realizado após restrição do DNA plasmídico extraído com as enzimas de restrição KpnI e XbaI, 90 V, 1h. A banda de 1kb corresponde à região do plasmídeo entre os locais de corte das enzimas, e a banda de 4,8kb ao restante cosmídeo. C: Gel de agarose a 0,8%, realizado após restrição do DNA extraído com a enzima PacI, 90 V, 1,30 h. A banda de dimensões superiores a 10kb poderá indicar o sucesso da ligação, uma vez que as colónias foram isoladas a partir de um meio seletivo.

O passo seguinte seria a transdução para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, no entanto nunca se obtiveram eletrotransformantes com a construção desejada. Uma vez que esta técnica envolve a introdução de uma construção genética de elevada dimensão na célula micobacteriana, um processo tipicamente complexo e com relativa baixa eficiência, sobretudo em micobactérias de crescimento lento<sup>137</sup>. Em conjunt com as dificuldades associadas à recombinação homóloga, este é um processo desafiante ainda por terminar num período posterior à entrega da presente dissertação.

## 5. Discussão final e perspectivas futuras

O processo de interação entre *M. tuberculosis* e o sistema imunitário do hospedeiro, nomeadamente ao nível dos macrófagos, é determinante para a persistência deste agente no interior do hospedeiro. Os atuais modelos de persistência descrevem uma população latente, capaz de reativar perante imunossupressão do hospedeiro, especulando-se se, em dada fase do processo de infeção, as micobactérias poderão assumir uma organização, estrutura e comportamento fisiológico semelhantes aos demonstrados por biofilmes microbianos. Uma das componentes mais relevantes ao nível da formação de biofilmes está relacionada com a parede celular das bactérias que os constituem, que funciona como interface no contacto com superfícies bióticas e abióticas. Neste âmbito, a presença de glicolípidos, como o PGL, na parede das micobactérias assume especial interesse. Para estudar a relação entre a presença de PGL e a formação de biofilmes, foram selecionados dois genes, *pks15* e *pks1*, potencialmente envolvidos na formação de glicolípidos celulares, nomeadamente PGL, e cuja ausência foi recentemente associada à ausência da produção de PGL e a diferenças na adesão das células a superfícies<sup>67,70,72</sup>. Acresce que *pks1* se encontra eliminado na que é hoje considerada a estirpe de referência para micobactérias patogénicas, *M. tuberculosis* H37Rv.

Na análise bioinformática dos polimorfismos dos genes *pks1* e *pks15*, verificou-se que o domínio onde se regista mais alterações é o da cetoreductase (KR). Contudo, é no domínio da cetoacilsintetase (KS) onde se verificam alterações mais frequentes nas estirpes estudadas, sendo na sua região de interseção com o domínio da acilotransferase (AT) (que coincide com a região intergénica entre *pks15* e *pks1*), que ocorrem vários polimorfismos que podem provocar a disrupção da grelha de leitura e impedir a transcrição de *pks1*. Os polimorfismos detetados exemplificam bem a necessidade do estudo aprofundado dos genomas de isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, uma vez que cada um dos polimorfismos detetados tem o potencial de alterar o fenótipo das estirpes e, subsequentemente, o processo de interação com o hospedeiro.

Na modelação da estrutura tridimensional das proteínas codificadas por *pks1* e *pks15* verificaram-se rearranjos tridimensionais distintos em diversas estirpes de *M. bovis* e *M. tuberculosis* que apresentavam polimorfismos naquelas duas CDS, indicando alterações da posição espacial dos domínios funcionais, assim como alterações funcionais e mesmo ausência de extensas regiões da proteína “selvagem”, o que se pode repercutir na interação com ligandos/substratos e, consequentemente, na função biológica exercida. Aquando da análise filogenética, foi possível verificar que estes genes apresentam uma história microevolutiva diferente em isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, que presumivelmente refletem a adaptação dos agentes etiológicos aos respetivos hospedeiros e a zonas geográficas, verificando-se igualmente um cenário de pressão seletiva em *M. bovis* para conservação do gene, o que poderá significar que a proteína exerce uma função fisiológica importante. Há ainda que considerar o cenário de pseudogenização destas ORFs em *M. tuberculosis*, dado o elevado número de genomas com frequentes mutações e codões STOP

prematureos no gene *pk1*. Quanto às estirpes de campo de *M. bovis* sequenciadas, nenhuma apresentou polimorfismos na região intergênica entre *pk15* e *pk1*.

Na análise da resposta fisiológica de estirpes virulentas de *M. bovis* perante diferentes condições ambientais selecionadas que se julga mimetizar o ambiente do hospedeiro, nomeadamente o stresse oxidativo, nitrosativo e a presença de colesterol, confirmou-se a capacidade de *M. bovis* formar biofilmes e aferiram-se várias condições ambientais nas quais essa capacidade é evidente. Destaca-se sobretudo o efeito provocado pelo ácido ascórbico, em que a sua presença estimulou a taxa de crescimento celular e a formação de biofilme, assim como a ação conjunta de ácido ascórbico com metil de viologénio, que potencia a taxa de crescimento e a formação de biofilme para valores francamente superiores ao do controlo e mesmo ao efeito isolado exercido pelo ácido ascórbico. Contudo, há que sublinhar que, de uma forma geral, a presença dos diferentes tipos de compostos testados levou a uma diminuição de viabilidade que se traduziu na diminuição da formação de biofilme. Há ainda que considerar não apenas o efeito bactericida ou bacteriostático dos compostos, mas também o seu efeito no *fitness* bacteriano ao forçar os microrganismos a ativar a maquinaria genética necessária para lidar com a condição específica a que é exposto.

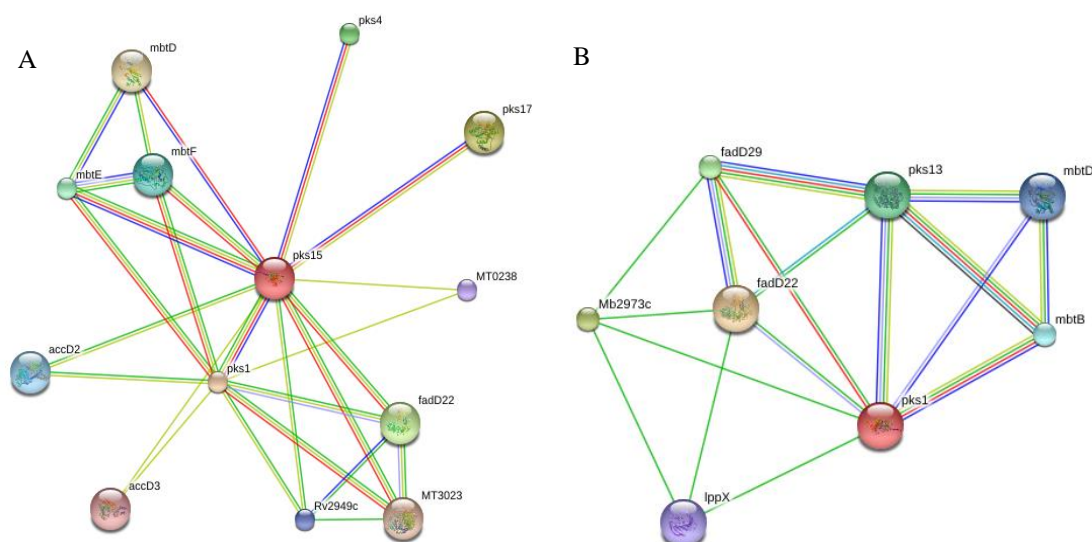
A análise da associação entre a formação de biofilmes sob diferentes condições ambientais com a estrutura química e quantidade relativa dos lípidos membranares, com especial enfoque para o PGL, também permitiu verificar que as diferentes condições do meio de cultura afetam os lípidos celulares formados. A caracterização dos lípidos celulares produzidos por técnicas analíticas mais discriminatórias e potentes, tais como LC-MS/MS, permitirá com certeza no futuro explorar a sua natureza química e potencial associação aos efeitos fisiológicos exercidos pelos diferentes compostos.

Relativamente à análise transcricional dos genes *pk1* e *pk15* por quantificação relativa da sua expressão em condições de stresse selecionadas por recurso a RT-qPCR, verificou-se que esta se encontra aumentada perante todas as condições analisadas. Apesar das diferenças experimentais com estudos anteriores, este trabalho evidencia os efeitos que as diferentes condições que mimetizam o ambiente do hospedeiro exercem na expressão dos genes *pk1* e *pk15* e, subsequentemente, na produção de PGL, sugerindo um papel importante destes dois genes na resposta a stresses e alterações no ambiente extracelular.

Em termos de perspetivas, consideram-se que seria útil explorar futuramente: a análise de expressão génica na presença de outros compostos, nomeadamente a associação entre ácido ascórbico e MV; a caracterização bioquímica dos diferentes perfis lipídicos observados; incluir *M. tuberculosis* H37Rv nos estudos experimentais realizados neste trabalho, para se avaliar a resposta fisiológica de uma estirpe que naturalmente não expressa *pk1* e não produz PGL; a finalização do mutante para o gene *pk1* e posterior comparação do seu fenótipo relativamente a estirpes selvagens, o que permitirá inferir uma relação direta entre a função do gene e a resposta aos stresses em análise; ensaios *in vitro* em linhas celulares de macrófagos, que permitirão a avaliação e comparação da sobrevivência intracelular entre estirpes mutantes e selvagens; e finalmente, ensaios *in vivo* em modelos animais de infeção, o que permitirá

analisar as diferenças ao nível da virulência, quer através da sobrevivência dos animais em estudo, quer através da análise das lesões histológicas provocadas.

Apesar de se redobram os esforços para compreender os mecanismos moleculares de adaptação das micobactérias ao hospedeiro, uma das principais limitações ao estudo do comportamento de *M. bovis* e de outras espécies do MTC reside no facto de, *in vivo*, as interações serem muito mais complexas e multifatoriais do que o que é possível simular em laboratório. Um exemplo claro desta complexidade é a própria família PKS, que se presume estar sob a ação de uma intensa rede regulatória (Fig.5.25.), e que sugere que a análise da presença ou ausência da expressão de *pkgs1* não deve ser realizada isoladamente, mas sim inserida num plano muito mais abrangente e onde existem outros genes com semelhanças funcionais associadas. Por exemplo, genes como *pkgs8* e *pkgs7* possuem uma elevada percentagem de semelhança genética quando comparados a *pkgs15-1* (72,2% e 74%, respetivamente) (NCBI) e também eles presumivelmente envolvidos na síntese de lípidos na célula<sup>92</sup>.



**Figura 5.25: Interações previstas *in silico*: A: entre a proteína Pks15 de *M. tuberculosis* H37Rv e outras proteínas presentes no seu genoma (com elevada confiança:  $\geq 0,7$ ); B: entre a proteína Pks15-1 de *M. bovis* AF2122/97 e outras proteínas presentes no seu genoma (com confiança média:  $\geq 0,4$ )). Legenda: verde: na vizinhança; vermelho: fusão de genes; Amarelo: co-mencionados em artigos científicos (Pubmed) Azul: co-ocorrência. Adaptado de Kuhn *et al.*<sup>97</sup>.**

O facto de neste trabalho não se ter demonstrado a associação direta entre os genes estudados e a formação de biofilmes não invalida que este processo não possa ser relevante na adaptação deste microrganismo ao seu nicho ecológico. Assim, para melhor compreender a relação entre micobactérias, a sua capacidade de infeção e as respostas de defesa do hospedeiro, será necessário o desenvolvimento de mais estudos, multifatoriais, para compreender o balanço das forças entre agente/hospedeiro, que comumente culmina em infeções clínicas latentes, uma característica chave da tuberculose.

## 6. Referências bibliográficas

- 1 – WHO, 2015. "Tuberculosis: Fact sheet N°104". [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>. [Acedido em 06 Junho de 2016]
- 2 – Phillips *et al.*, 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science* 74(1): 1–15
- 3 – Shrikrishna *et al.*, 2009. Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat?. *Thorax* 64(11): 89-91



- 4 – Thoen *et al.*, 2009. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Rivista trimestrale di Sanità Pubblica Veterinaria* edita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale' 45(1): 135-181
- 5 – CFSPH: Center for Food Security and Public Health, 2009. Bovine tuberculosis. CFSPH, 1-6.
- 6 – WAHID: World Animal Health Information Database Interface WAHID, 2013. WAHID: World Animal Health Information Database Interface. [Online]. Available: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home). [Acedido em 21 de Junho de 2016]
- 7 – Michel *et al.*, 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not?. *Veterinary Microbiology* 140(3-4): 371–381
- 8 – EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2014. Statement on a conceptual framework for bovine tuberculosis. *EFSA: European Food Safety Authority* 12(5): 3711
- 9 – EC: European Commission, 2014. Standard requirements for the submission of programme for eradication, control and monitoring, PROGRAMME for ERADICATION : ANNEX I. 1-38
- 10 – Duarte *et al.*, 2007. Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 102: 299-303
- 11 – Duarte *et al.*, 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology* 130(3-4): 415–421
- 12 – Ryan & Ray, 2004. Sherris: MEDICAL MICROBIOLOGY. 5ª Edição, The McGraw-Hill Companies, Estados Unidos da America
- 13 – EFSA; European Food Safety Authority; ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10(3)
- 14 – Aranaz *et al.*, 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6): 2602–2608
- 15 – Parra *et al.*, 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Research in Veterinary Science* 80(2): 140–146
- 16 – Vicente *et al.*, 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research* 37(1): 107-119
- 17 – Cunha *et al.*, 2012. Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: A molecular epidemiology perspective. *Research in Veterinary Science* 92(2): 225–235
- 18 – Dean *et al.*, 2005. Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Infection and Immunity* 73(10): 6467–6471
- 19 – Rua-Domenech, 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86(2): 77-109
- 20 – Madigan *et al.*, 2012. Brock: Biology of Microorganisms, 13ª Edição, Pearson Education
- 21 – Smith *et al.*, 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews, Microbiology* 7: 537-544
- 22 – Euzéby, 1997. List of prokaryotic names with standing in nomenclature [Online]. Available: <http://www.bacterio.net/index.html>. [Acedido em 29 Agosto 2015]
- 23 – Hartmans *et al.*, 2006. The Genus *Mycobacterium* – Nonmedical. *Prokaryotes*, Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 3ª Edição. Springer, New York. 889-918
- 24 – Amanda *et al.*, 1999. Oxygen Depletion-Induced Dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology* 181(7): 2252–2256
- 25 – Saviola *et al.*, 2006. The Genus *Mycobacterium*—Medical. *The Prokaryotes*. Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, Springer, New York, 919-933
- 26 – Carr, 2006. Under a high magnification of 15549x, this scanning electron micrograph (SEM) depicted a number of Gram-positive *Mycobacterium tuberculosis* bacteria. CDC/ Ray Butler, MS, CDC - Nat. Center for HIV, STD, and TB Prevention, Div. of Tuberculosis Elimination.
- 27 – Rastogi *et al.*, 2001. The *Mycobacteria*: An introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et technique (International office of epizootics)* 20(1): 21-54
- 28 – Brosch *et al.*, 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS* 99(6): 3684-3689
- 29 – Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex
- Huard *et al.*, 2006. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Bacteriology* 188 (12): 4271–4287
- 30 – Aranaz *et al.*, 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(6): 1785–1789
- 31 – Ocepek *et al.*, 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 43(7): 3555–3557
- 32 – Kiers *et al.*, 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammal. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 12(12): 1469–1473
- 33 – Smith *et al.*, 2009. *Mycobacterium microti*: More Diverse than Previously Thought. *Journal of Clinical Microbiology* 47(8): 2551–2559
- 34 – Tsolaki *et al.*, 2003. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4865–4870
- 35 – Gordon *et al.*, 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular Microbiology* 32(3): 643–655
- 36 – Brites & Gagneux, 2015. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological Reviews* 264(6): 6-24
- 37- Smitha *et al.*, 2006. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology* 239(2): 220–225
- 38 – Tan *et al.*, 2006. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cellular Microbiology* 8(9): 1417–1429
- 39 – Guinn *et al.*, 2004. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 51(2): 359–370
- 40 – Mahairas *et al.*, 1996. Molecular Analysis of Genetic Differences between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology* 178(5): 1274–1282
- 41 – O'Reilly & Daborn, 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease* 76: 1-46
- 42 – Cosivi *et al.* 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *CDC - Centers for Disease Control and Prevention* 4(1): 59-70
- 43 – Drobniewski *et al.* 2003. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. *Epidemiology and Infection* 130(2): 235-237
- 44 – Pieters, 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection* 3(3): 249–255
- 45 – Russell, 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 569-586
- 46 – Korbel *et al.*, 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection* 10(9): 995–1004
- 47 – Gengenbacher & Kaufmann, 2012. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiology Review* 36: 514–532
- 48 – Kindt *et al.*, 2007. Kuby Immunology, 4ª ed., W.H. Freeman and Company
- 49 – Yates *et al.*, 2005. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* 6(5): 413-420
- 50 – Pieters & Sundaramurthy, 2007. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and Infection* 9(14-15): 1671–1679



- 51 – Wurmser *et al.*, 1999. Phosphoinositide 3-Kinases and Their FYVE Domain-containing Effectors as Regulators of Vacuolar/Lysosomal Membrane Trafficking Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 274(14): 9129-9132
- 52 – Ferrari *et al.* 1999. A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of Mycobacteria. *Cell* 97(4): 435–447
- 53 – Walburger *et al.*, 2004. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304(5678): 1800-1804
- 54 – Ehrt & Schnappinger, 2009. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular Microbiology* 11(8): 1170–1178
- 55 – Hu & Coates, 2009. Acute and Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Infections Depend on the Thiol Peroxidase TPX. *PLOS one* 4(4), DOI:
- 56 – BEDARD K, KRAUSE K, 2007. The Nox Family Of Ros-Generating NADPH Oxidases. *Physiol Rev* 87: 245–313
- 57 – Virag *et al.*, 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters* 11(140-141): 113-124
- 58 – Schnappinger *et al.*, 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *JEM: The Journal of Experimental Medicine* 198(5): 693–704
- 59 – Boon & Dick, 2012. How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later. *Future Microbiol.* 7(4): 513–518
- 60 – Leistikow *et al.*, 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Assists in Metabolic Homeostasis and Enables Rapid Recovery from Nonrespiring Dormancy. *Journal of Bacteriology*, 192(6): 1662–1670
- 61 – Sousa EH, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA. 2007. DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Science*. 16:1708–1719
- 62 – Rodríguez JG *et al.* 2014. Global Adaptation to a Lipid Environment Triggers the Dormancy Related Phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *American Society for Microbiology*. 5:1-14
- 63 – Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*. 53 (2): 391-403.
- 64 – Ouellet H, Johnston JB, de Montellano PR. 2011. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiology*. 19 (11): 530–539
- 65 – Källénius G, Correia-Neves M, Buteme H, Hamasur B, Svenson SB. 2015. Lipoarabinomannan, and its related glycolipids, induce divergent and opposing immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* depending on structural diversity and experimental variations. *Tuberculosis*. 1-11
- 66 – Rousseau C *et al.* 2004. Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cellular Microbiology*. 6(3): 277–287
- 67 – Siméone R *et al.* 2010. Delineation of the roles of FadD22, FadD26 and FadD29 in the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates and related compounds in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal*. 2715–2725
- 68 – Ferreras JA *et al.* 2008. Mycobacterial PGL virulence factor biosynthesis: mechanism and small-molecule inhibition of polyketide chain initiation. *Chemistry & Biology*. 15 (1): 51–61
- 69 – Astarie-Dequeker C *et al.* 2009. Phthiocerol Dimycocerosates of *M. tuberculosis* Participate in Macrophage Invasion by Inducing Changes in the Organization of Plasma Membrane Lipids. *PLOS ONE: Pathogens*. 5 (2): 1-16
- 70 – Pang JM *et al.* 2012. The Polyketide Pks1 Contributes to Biofilm Formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 194 (3): 715-721
- 71 – Pérez E *et al.* 2004. Molecular dissection of the role of two methyltransferases in the biosynthesis of phenolglycolipids and phthiocerol dimycocerosate in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The Journal of biological Chemistry*. 279 (41): 42584–42592.
- 72 – Constant P *et al.* 2002. Role of the *pks15-1* Gene in the Biosynthesis of Phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (41): 38148–38158
- 73 – Bus JS, Aust SD, Gibson JE. 1976. Paraquat Toxicity: Proposed Mechanism of Action Involving Lipid Peroxidation. *Environmental Health Perspectives*. 16: 139-146
- 74 – Singh A *et al.* 2009. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 Maintains Redox Homeostasis by Regulating Virulence Lipid Anabolism to Modulate Macrophage Response. *PLOS ONE: Pathogens*. 5 (8): 1-16
- 75 – Griffin JE *et al.* 2012. Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chemistry & Biology*. 19 (2): 218–227
- 76 – Vilchèze C, Hartman T, Weinrick B, Jacobs WR Jr. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nature communications*. 4 (1881): 1-23.
- 77 – Brzostek A *et al.* 2007. Cholesterol oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 276: 106-112
- 78 – Chang JC *et al.* 2009. *igr* Genes and *Mycobacterium tuberculosis* Cholesterol Metabolism. *Journal of Bacteriology*. 191 (16): 5232-5239
- 79 – Bartos M, Falkinham JO, Pavlik I. 2004. Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria – a review. *Veterinari Medicina*. 49 (5): 161–170
- 80 – Kang SK, Chung TW, Lee JH, Kim CH. 2006. Cloning and expression of superoxide dismutase from *Mycobacterium bovis* BCG. *Protein Expression and Purification*. 47(1); 52-59
- 81 – Colangeli R *et al.* 2009. The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *PNAS*. 106 (11): 4414-4418.
- 82 – JoAnne JC, Flynn L. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. 19: 93-129
- 83 – Michael Dunne JW. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (2): 155-166
- 84 – Phillips PL *et al.* 2010. Biofilms made easy. *Wounds international*. 1 (3): 1-6
- 85 – Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322
- 86 – George O'Toole, Heidi K, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology*. 54: 49-79
- 87 – Stewart PS, Costerton JW. 2001 Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-138
- 88 – Rodney JW, Donlan M. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (2): 167–193
- 89 – Ojha AK *et al.* 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular Microbiology*. 69 (1): 164–174
- 90 – Ojha AK *et al.* 2010. Enzymatic Hydrolysis of Trehalose Dimycolate Releases Free Mycolic Acids during Mycobacterial Growth in Biofilms. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (23): 17380–17389
- 91 – Islam. MS, Richards JP, Ojha AK. 2012. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert review of anti-infective therapy*. 10 (9): 1055–1066
- 92 – Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList - 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)*. Jan 91(1):1-7 (2011)
- 93 – Mitchell A. *et al.* "The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years", *Nucleic Acids Research*, jan 2015
- 94 – Galagan *et al.* "TB database 2010: overview and update", *Tuberculosis* 90(4):225-35
- 95 – Artimo *et al.* "ExPASy: SIB bioinformatics resource portal", *Nucleic Acids Res*, 40(W1):W597-W603, 2012.
- 96 – Kelley *et al.* "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis", *Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)
- 97 – Kuhn *et al.* "STITCH 4.0: Integration of protein-chemical interactions with user data.", *Nucleic Acids Research*, 42 (Fascículo da base de dados), [Acedido em 10 Junho 2016].
- 98 – A. Rambaut. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. 2007. Disponível online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. [Acedido em 10 Janeiro 2016]

- 99 - Bardarov S, *et al.* 2002. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*. 148: 3007-3017
- 100 - Kim MJ *et al.* 2010. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Molecular Medicine*. 2 (7): 258-274
- 111- Gatfield J, Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 288: 1647–1650
- 112 - Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. 2009. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *BJP: British Journal of Pharmacology*. 157 (7): 1097–1110
- 113 – Podmore ID *et al.* 1998. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 392
- 114 – Taneja NK *et al.* 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Transcriptional Adaptation Growth Arrest and Dormancy Phenotype Development Is Triggered by Vitamin C. *PLOS ONE*. 5 (5)
- 115 – Hemila H *et al.* 1999. Vitamin C and Other Compounds in Vitamin C Rich Food in Relation to Risk of Tuberculosis in Male Smokers. *American Journal of Epidemiology*, 150 (6): 632-641
- 117 - Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, Schoolnik GK. 2011. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontiers in microbiology*. 2: 1-12
- 118 - Kuroiwa Y *et al.* 2008. Combined ascorbic acid and sodium nitrite treatment induces oxidative DNA damage-associated mutagenicity in vitro, but lacks initiation activity in rat forestomach epithelium. *Toxicological Sciences*. 104: 274-282
- 119 – Okazaki K *et al.* 2006. Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: Possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Science*. 97 (3): 175–182
- 120 – Taneja NK *et al.* 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Transcriptional Adaptation, Growth Arrest and Dormancy Phenotype Development Is Triggered by Vitamin C. *PLOS ONE*. 5 (5): 1-13
- 121 – Weber I *et al.* 2000. Anaerobic nitrate reductase (narGHJ) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Molecular Microbiology*. 35 (5): 1017-1025
- 122 - Sohaskey CD, Wayne LG.. 2003. Role of narK2X and narGHJ in Hypoxic Upregulation of Nitrate Reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 185 (24): 7247–7256
- 123 - Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutic. *Nature Reviews*. 7: 156-167
- 124 – Mulder MA, Zappe H, Steyn LM. 1999. The *Mycobacterium tuberculosis* katG promoter region contains a novel upstream activator. *Microbiology*. 145: 2507–2518
- 125 – Fritz C, *et al.* 2002. Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on Anaerobic Nitrate Reductase for Persistence Is Tissue Specific. *INFECTION AND IMMUNITY*. 70(1): 286–291
- 126– Kennedy GM *et al.* 2014. A Novel ESX-1 Locus Reveals that Surface-Associated ESX-1 Substrates Mediate Virulence in *Mycobacterium marinum*. *Journal of Bacteriology*. 196 (10): 1877–1888
- 127 - Chagnot C, Zorgani MA, Astruc T, Desvaux M. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology*. 4: 1-26
- 128 - Montgomery MR, Furry J, Gee SJ, Krieger RI. 1982. Ascorbic Acid and Paraquat: Oxygen Depletion with Concurrent Oxygen Activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 63: 321-329
- 129 - Davis BD1, Dubos RJ. 1948. The inhibitory effect of lipase on bacterial growth in media containing fatty acid esters. *Journal of Bacteriology*. 55 (1): 11–23
- 130 - MIT OpenCourseWare. MIT OpenCourseWare:5.301 Chemistry Laboratory Techniques. Janeiro 2012. Disponível online: <http://ocw.mit.edu>. [Acedido em 13 Setembro 2015]
- 131 – Uchavadi SS. 2011. Inactivation of tesA Reduces Cell Wall Lipid Production and Increases Drug Susceptibility in Mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (28): 24616–24625
- 132 - Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, Schoolnik GK. 2011. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontiers in Microbiology*. 105 (2)
- 133 - Sherman DR *et al.* 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *PNAS*. 98: 98-111
- 134 - Honaker RW, Leistikow RL, Bartek IL, Voskuil MI. 2009. Unique roles of DosT and DosS in DosR regulon induction and *Mycobacterium tuberculosis* dormancy. *Infect Immun*. 77 (8): 3258-3263
- 135 - Nesbitt NM *et al.* 2010. A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infect Immun*. 78: 275-282
- 136 – Jain P *et al.* 2014. Specialized Transduction Designed for Precise High-Throughput Unmarked Deletions in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*. 5 (3): 1-9.
- 137 – Tufariello JM *et al.* 2014. Enhanced Specialized Transduction Using Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*. 5 (3): 1-7

## 6. Anexos

**Tabela A7.1 - Lista de sequências nucleotídicas e aminoácídicas utilizadas na análise bioinformática de polimorfismos dos genes *pkas15* e *pkas1*.** Estirpes com perfil polimórfico idêntico foram agrupadas, e uma das estirpes do grupo foi destacada e escolhida como representante. Os diferentes tons de cinza da última coluna da direita agrupam perfis polimórficos para as estirpes associadas quando comparada com a estirpe de referência (*M. tuberculosis* H37Rv). As estirpes sem polimorfismos face a *M. tuberculosis* H37Rv não foram consideradas para análises posteriores. I: Estirpe utilizada na identificação de polimorfismos nas sequências nucleotídicas dos genes *pkas15* e *pkas1* em *M. bovis* e *M. tuberculosis*. II: Identificação de polimorfismos nas sequências aminoácídicas dos genes *pkas15* e *pkas1* em *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

Ambito do estudo	Estirpe	Nº de acesso	Data da consulta	Ambito do estudo	Estirpe	Nº de acesso	Data da consulta	Polim.
I e II	<i>M. tuberculosis</i> 49-02	HG813240.1	25-02-15	II	<i>M. tuberculosis</i>	WP_003910947.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> HKBS1	CP002871.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> W-148	EGE51494.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> K	CP007803.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> KIN22620	KIN22620.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> BT2	CP002882.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> AJP81553	AJP81553.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> SISTEMA COMERCIAL87190	CP007809.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 02_1987	GCA_000658295.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 0B259XDR	CP008961.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 94_M4241A	EF131503.1, 09	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 0B123ND	CP008968.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 18b	AJK62976.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> NCGM2209	GAA46592.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> HKBS1	AHJ43746.1,	09-03-15	
II	<i>M. tuberculosis</i> Beijing/DS6701	KEP58732.1	09-03-15	II	<i>M. tuberculosis</i>	AIH25741.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	AIH49637.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> 0B026XDR	CP008972.1	25-02-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 7199-99	HE663067.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0B169XDR	CP008967.1	25-02-15	
I e II	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	AE000516.2	25-02-15					

	<i>M. tuberculosis</i> Kurono	AP014573.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0B228DS	CP008964.1	25-02-15	
	<i>M. tuberculosis</i> F11	CP000717.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> Beijing-NITR203	GCA_000364825	25-02-15	
II	<i>M. tuberculosis</i> RGTB327	CP003233.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> UT205	HE608151.1	25-02-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031725334.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031741420.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031749023.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031750272.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031651313.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031699741.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031664123.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031719316.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031726255.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_042904340.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031664618.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_021082770.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031739942.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031719014.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031690696.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031689497.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031657833.1	09-03-15					
	<i>M. tuberculosis</i> KT-0029	(KBM59683.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> KT-0014	KCF55907.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> KT-0011	KCF56292.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> KT-0047	KCG10865.1,	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> KT-0072	KCG57122.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> KT-0071	KCG60366.1,	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> KT-0075	(KCG65015.1, 09-03-15),	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> KT-0080	KCG71601.1, 09-03-15	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> KT-0084	KCG80888.1,	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> KT-0085	KCG87404.1,	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> KT-0098	KCH12112.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> KT-0107	KEC32168.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> H3360	GCA_000665525.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> OFXR-9	GCA_000681335.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> OFXR-8	GCA_000667905.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i> OFXR-17	GCA_000667935.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> OFXR-10	GCA_000660105.1	09-03-15					
	<i>M. tuberculosis</i>	KDM95215.1	09-03-15	II	<i>M. tuberculosis</i>	KEG26103.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i>	KEG29959.1	09-03-15					
II	<i>M. tuberculosis</i> FJ05194	GCA_000454325.1	09-03-15	II	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031714327.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 96075	CP009426.1,	25-02-15	II	<i>M. tuberculosis</i>	WP_038438679.1	09-03-15	
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv3	CP009480.1,	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i> CDC5079	CP002884.1,	25-11-14	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> RGTB327	CP003233.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i> CDC5180	CP001642.1	25-11-14	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> Beijing-NITR203	GCA_000364825.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i> T67	KB36608.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> UT205	HE608151.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031649433.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> 96075	CP009426.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031647606.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> 0B229DS	CP008963.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031721988.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> EA15-NITR206	CP005387.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031716786.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> 0B228DS	CP008964.1,	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031660144.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> 0B026XDR	CP008972.1,	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031659292.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i> 0B169XDR	CP008967.1	25-11-14		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031674958.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031725542.1	09-03-15	II	<i>M. tuberculosis</i>	WP_038436837.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031724439.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031752161.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031653922.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031752161.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_034169613.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031715455.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031733907.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031682972.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031702893.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031679167.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031717267.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031677450.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031687941.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031740232.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031716132.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031680652.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031678814.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031737486.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031733337.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031667413.1	09-03-15	Perfil único
	<i>M. tuberculosis</i>	WP_031718109.1	09-03-15		<i>M. tuberculosis</i>	WP_031723329.1	09-03-15	Perfil único
I e II	<i>M. bovis</i> 08-08BF2	(JQET01000001.1	25-11-14	I e II	<i>M. bovis</i> 0822-11	JQEW01000001.	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> AN5	(AWPL01000001.1	27-11-14					
II	<i>M. bovis</i> BCG str. ATCC 35743	(GCA_000194075.3	25-11-14	II	<i>M. bovis</i>	KIU59787.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i>	KIX88641.1	25-11-14					
	<i>M. bovis</i> AF2122-97	BX248338.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> AF2122/97 (	Q7TXK8.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 04-303 MB04303	AVSW01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> AF2122/97 (	CAD96658.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 534 MB534	JQEM01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> 04-303 (	ESK74491.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 61-09 MB6109	JQEX01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> BCG	KEC51266.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 50 MB50	JQEU01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i>	AIH71585.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 45-08B MB4508B	JQEP01000001.1	25-02-15	II	<i>M. bovis</i>	KEY07880.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 32-08 MB3208	JQER01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i>	KEY08646.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 18-08C MB1808C	JQEQ01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i>	KEY08907.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 09-1193 MB091193	JQEN01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> AF2122/97 (	NP_856616.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 09-1192 MB091192	JQEO01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i>	WP_039847076.1	09-03-15	
	<i>M. bovis</i> 09-1191 MB091191	JPPF01000001.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> BCG Moreau	AM412059.2	25-02-15	

	<i>M. bovis</i> strain 05-567 MB05567	JPFQ01000030.1	25-02-15		RDJ			
	<i>M. bovis</i> strain 05-566 MB05566	JPFR01000035.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> BCG Mexico	CP002095.1	25-02-15	
	<i>M. bovis</i> BCG Tokyo 172	AP010918.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> BCG Korea 1168P	CP003900.2	25-02-15	
II	<i>M. bovis</i>	WP_038438826.1	25-02-15		<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	AM408590.1	25-02-15	Perfil único
					-	-	-	
I	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv2	AL123456.3	25-02-15	I	<i>M. tuberculosis</i> Haarlem	CP001664.1	23-10-15	Sem polim. detetado
	<i>M. tuberculosis</i> H37RvSiena	CP007027.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A029DS	CP008981.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> HaarlemNITR202	CP004886.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A033DS	CP008980.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 0B218DS	CP008966.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A087DS	CP008978.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 0B222DS	CP008965.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A092DS	CP008977.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 0B235DS	CP008962.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A093DS	CP008976.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 0B329XDR	CP008960.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A094DS	CP008975.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> 96121	CP009427.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A115DS	CP008974.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> ZMC13-88	CP009101.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0A117DS	CP008973.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> ZMC13-264	CP009100.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0B049XDR	CP008971.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> EAI5	CP006578.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0B070XDR	CP008970.1	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> RGTB423	CP003234.1	25-02-15		<i>M. tuberculosis</i> 0B076XDR	CP008969	23-10-15	
	<i>M. tuberculosis</i> Erdman/ATCC 35801	AP012340.1	25-02-15					

**Tabela A7.2. Dados e características genóticas das estirpes de campo de *M. bovis* estudadas.** Descritas a identificação da estirpe, hospedeiro, distrito, spoligótipo e âmbito do estudo em que foram utilizadas. A: análise de polimorfismos na região intergênica entre *pk15* e *pk1*. B: Crescimento celular e formação de biofilme na presença de múltiplos stresses. C: Crescimento celular em descontinuo na presença de múltiplos stresses. D: Análise do perfil lipídico de *M. bovis* II. E: Construção do mutante de eliminação do gene *pk1*.

Estirpe/Identificação	Hospedeiro	DISTRITO	Spoligo/Genótipo	Âmbito do estudo
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	-	-	Ept <sup>+</sup> , Kan <sup>S</sup>	B, C
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo	-	-	SB0120	B, C
<i>M. bovis</i> VI	Bovino	CASTELO BRANCO	SB0121	A, B
<i>M. bovis</i> III	Bovino	BEJA	SB0121	A, B
<i>M. bovis</i> II	Bovino	LISBOA	SB0121	A, B, C, D
<i>M. bovis</i> I	Bovino	SANTARÉM	SB0121	A, B
302	Bovino	BEJA	SB0121	A
276	Bovino	PORTO	SB0121	A
b	Bovino	BRAGA	SB0121	A
282	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
283	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
285	Bovino	SETUBAL	SB0121	A
83	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
193	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
84	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
33	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
a	Veado	CASTELO BRANCO	SB0121	A
187	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
231	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
188	Bovino	SANTARÉM	SB0121	A
325	Bovino	COIMBRA	SB0121	A
326	Bovino	VILA REAL	SB0121	A
152	Bovino	SANTARÉM	SB0121	A
278	Bovino	PORTO	SB0121	A
92	Bovino	VILA REAL	SB0121	A
56	Bovino	ÉVORA	SB0121	A
<i>E. coli</i> HB101			Δ ( <i>gpt-proA</i> )62 <i>leuB6 thi-1 lacY1 hsdSB20 recA rpsL20</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrBB</i>	E
<i>E. coli</i> DH5α (NZYStar)			<i>endA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ΔM15: Tn10</i> (Tc <sup>R</sup> )]	E

**Tabela A7.3. - Composição e modo de preparação dos meios de cultura, tampões e soluções utilizados no presente trabalho.**

Meios/Reagentes	Composição/Litro
Middlebrook 7H9	BDDifco™. Pesados 4,7 g. Adicionados 10% (v/v) ADS e 2 ml glicerol ou 0,5% piruvato de sódio.
Middlebrook 7H10	BDDifco™. Pesados 19 g. Adicionados 10% (v/v) ADS e 5 ml glicerol ou 0,5% piruvato de sódio.
Lowenstein Jensen piruvato	Biogerm
Stonebrink	Biogerm
LB	10 g Tripton; 5 g Extrato de levedura; 5 g Cloreto de sódio; 15 g de Agar. Autoclavado
SOC	0,5% (m/v) Extrato de levedura; 2% (m/v) Tripton; 10 mM Cloreto de sódio; 25 mM Cloreto de potássio; 10 mM Cloreto de magnésio; 20 mM Sulfato de magnésio; 20 mM Glucose. Filtrado com 0,22 µm.
Top Agar	0,7% (m/v) Agar; 0,4% (m/v) Glicerol; 0,022% (m/v) Cloreto de cálcio. Autoclavado.
Colesterol a 1%	Preparar stock de colesterol [20 mg/ml] em Tween80 a 20%. Autoclavar e ferver para dissolver na totalidade. Efetuar diluição (1:20) em meio líquido Middlebrook 7H9 e ferver até dissolver.
NPS 1M	2,97 g de NPS, dissolvido em 10 ml de meio líquido Middlebrook 7H9. Filtrado 0,22 µm.
Suplemento ADS 10x	50 g BSA (fração V da albumina sérica bovina); 20 g Glucose; 8,5 g Cloreto de sódio. Filtrado 0,22 µm.
TBE 10X	108 g Tris Base, 55 g ácido bórico, 40 ml EDTA a 0,5 M.
DEPC	Fornecedor: Sigma-Aldrich
Tampão MP	50 mM TrisÁcido Clorídrico; 150 mM Cloreto de sódio; 10 mM Cloreto de magnésio; 2 mM Cloreto de cálcio.
Tampão SM	5,8 g Cloreto de sódio; 2 g Sulfato de magnésio; 50 mM 1 M TrisÁcido Clorídrico; 5 ml Agar 2% (m/v).

**Tabela A.7.4 - Lista de primers utilizados no presente trabalho.**

Região alvo	Posição no genoma	Sequência oligonucleotídica dos Primers	Massa Molecular do fragmento (pb)	Referências/ objetivo
<i>pk15-1</i>	3284839 - 3284820 3284313 - 3284332	5' gcaggcgatgcgtcatggg 3' 5' tcttcccaccgacctggc 3'	520	(Constant, <i>et al.</i> , 2002) <sup>72</sup> (sequencição)
16S	1468929 - 1468948 1469181 - 1469200	5' aagaagcaccgccaactac 3' 5' tcgctcctcagcgtcagta 3'	272	Este trabalho (expressão genética)
3' <i>pk15</i>	3289952 - 328997 3289829 - 3289848	5' cagacgtagacgtgtggag 3' 5' gccatgttcgacttgattg 3'	143	Este trabalho (expressão genética)
3'+ <i>pk1</i>	3284853 - 3284872 3284746 - 3284765	5' tcgactcataacggctgtg 3' 5' attgtctggcgacatactc 3'	127	Este trabalho (expressão genética)
<i>pk1FR1</i>	3288944 - 3288961 3287978 - 3287996	5' atcgactagtcgggtgtgtgacgttg 3' 5' atcgaagcttcacgacccaactctcgat 3'	983	Este trabalho (expressão genética)
<i>pk1FR2</i>	3285370 - 3285386 3284432 - 3284451	5' atcgctagacaactactcgcggaac 3', 5' atcgggtaccacctagcaccacgacca 3'	954	Este trabalho (expressão genética)

**Tabela A.7.5: Informações relativas às condições reacionais e condições de PCR utilizadas no presente trabalho.**

Região Alvo/ Objetivo	Condições reacionais	Condições PCR
Análise da região de interseção entre os genes <i>pk15</i> e <i>pk1</i> em estirpes de campo <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	Tampão de <i>Taq</i> DNA polimerase 1x (Promega), MgCl <sub>2</sub> (Promega), - 100 µM de dNTPs (Promega), - 0,4 µM de cada um dos primers (Invitrogen), - 0,5 U de enzima <i>Taq</i> DNA polimerase (Promega) - 100 ng de DNA - Perfazendo os 25 µL com H <sub>2</sub> O para PCR (nzytech).	Desnaturação inicial: 1 ciclo de 10 min a 95 °C 35 ciclos de: - desnaturação: 95 °C de 30 s - hibridação: 57 °C, de 30 s - extensão: 72 °C, de 30 s Extensão final: 72 °C, 10 min
Otimização em PCR convencional  (Expressão genética <i>pk15</i> , <i>pk1</i> e <i>rRNA</i> 16S)	- 10 µl de NZYTaq 2x Green Master Mix, - 0,4 µl ou 0,8 µl de MgCl <sub>2</sub> - 1 µl de cada primer - 1 µl de DNA - 6,6 µl ou 6,2 µl de H <sub>2</sub> O. - 20 µl de controle negativo	Desnaturação inicial: 95 °C, 120 s 34 ciclos de: - desnaturação: 95 °C, 30 s - hibridação: 55 °C, 30 s - extensão: 72 °C durante, 30 s Extensão final: 72 °C, 10 min
Otimização da reação de PCR em tempo real  (Expressão genética <i>pk15</i> , <i>pk1</i> e <i>rRNA</i> 16S)	- 10 µl de tampão de reação EvaGreen® Master Mix - 0,5 µl de MgCl <sub>2</sub> - 0,6 µl de cada primer - 1 µl de DNA - 7,8 µl de H <sub>2</sub> O (perfazer volume). - 20 µl controle negativo	Desnaturação inicial: 95 °C, 2 min 49 ciclos: - hibridação e extensão: 60 °C, 30 s (com leitura da fluorescência no final de cada ciclo) - desnaturação com intervalo de T° entre 65 °C e 95 °C, com incremento de 0,5 °C a cada 5 s (com leitura da fluorescência)
RT-qPCR  (Expressão genética <i>pk15</i> , <i>pk1</i> e <i>rRNA</i> 16S)	- 5 µl de tampão de reação iTaq Universal SYBR 2x - 0,125 µl de Transcriptase Reversa - 0,3 µl de cada primer, - RNA (o volume equivalente a uma concentração final de RNA de 20 ng/µl) - H <sub>2</sub> O - controle sem a adição de RNA - controle sem a adição de transcriptase reversa.	Reação transcriptase reversa: 50 °C, 30 min Ativação da polimerase e desnaturação do cDNA: 95 °C, 1 min 49 ciclos de: - desnaturação: 95 °C, 10 s - hibridação e extensão : 60 °C, 30 s (com leitura da fluorescência no final de cada ciclo) - desnaturação com intervalo de T° entre 65 °C e 95 °C, com incremento de 0,5 °C a cada 5 s (com leitura da fluorescência).
Amplificação da região a montante e jusante do gene <i>Rv1358</i>  (construção do mutante de eliminação)	volume final de 20 µl: - 10 µl de Phusion® High-Fidelity Master Mix 2x (NEB) - 0,6 µl de DMSO - 1 µl de cada primer (Nzytech), - 1 µl de DNA ( <i>M. bovis</i> ) - 6,4 µl de H <sub>2</sub> O)	Desnaturação inicial: 98 °C, 30 s 29 ciclos de: - desnaturação: 98 °C, 10 s, - hibridação: 69,5 °C, 30 s, - extensão: 72 °C, 30 s. Extensão final: 72 °C 10 min